

**Untersuchungen über die
durch endogene mRNS gesteuerte
zellfreie Proteinbiosynthese
mit einem System aus Saccharomyces**

**Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Bernd Schulz-Harder
aus Berlin**

1976

**Untersuchungen über die
durch endogene mRNA gesteuerte
zellfreie Proteinbiosynthese
mit einem System aus Saccharomyces**

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Schulz-Harder
aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

2. Referent: Prof. Dr. E. Riedel

Tag der mündlichen Prüfung: 8.6.1976

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
2. <u>EINLEITUNG</u>	3
3. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	6
3.1 Material	6
3.1.1 Chemikalien	6
3.1.2 Geräte	7
3.1.3 Medien	8
3.1.4 Stämme	8
3.1.5 Radioaktive Lösungen	9
3.1.6 Puffer	9
3.2 Methoden	10
3.2.1 Aufzucht der Hefen	10
3.2.2.1 Isolierung von Polyribosomen	10
3.2.2.2 Isolierung von " NaN_3 "-Ribosomen	11
3.2.3 Isolierung von ribosomalen 60S- und 40S-Untereinheiten	12
3.2.4 Isolierung von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren	12
3.2.5 Sedimentationsanalysen	13
3.2.6 Inkubationsbedingungen für zellfreie Systeme	14
3.2.6.1 Polyribosomensystem	14
3.2.6.2 PolyU-System	15
3.2.7 Ribonuklease-Bestimmung	15
3.2.7.1 Autodegradation von Polyribosomen	15
3.2.7.2 Autodegradation von ribosomalen Untereinheiten	16
3.2.7.3 Degradation von künstlicher mRNS (PolyU)	17
3.2.8 Saure Phosphatase-Test	17
3.2.9 Messung der Radioaktivität	17

4.	<u>ERGEBNISSE</u>	19
4.1	Isolierung und Charakterisierung von Polyribosomen	19
4.1.1	Polyribosomenisolierung	19
4.1.2	Polyribosomengehalt in Abhängigkeit von der Wachstumsphase	20
4.1.3	Ribonuklease-Sensitivität der Polyribosomen	22
4.1.4	Nachweis von wachsenden Polypeptidketten an Polyribosomen	23
4.2	Isolierung von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren	25
4.3	Zellfreies Polyribosomen-abhängiges Protein-synthetisierendes System	27
4.3.1	Abhängigkeit von der Polyribosomenkonzentration	27
4.3.2	Inkubationstemperatur	28
4.3.3	Energie-lieferndes System	29
4.3.4	MgCl ₂ - und KCl-Konzentrationen	33
4.4	Wirkung von Antibiotika auf die Polyribosomen-abhängige Proteinbiosynthese	35
4.4.1	Hemmung der Initiation	35
4.4.2	Inhibition der Elongation von 80S-Ribosomen	36
4.5	Vergleich der optimalen Ionenkonzentrationen von Transkription und Translation	37
4.5.1	MnCl ₂ - und MgCl ₂ -Konzentrationen	37
4.5.2	KCl- und (NH ₄) ₂ SO ₄ -Konzentrationen	38
4.6	Polyribosomenisolierung nach Induzierung der sauren Phosphatase von Schizosaccharomyces pombe	39
4.7	Ribosomale Ribonuklease	41
4.7.1	Autodegradation von Polyribosomen	41
4.7.2	Untersuchungen über die Ribonuklease-Aktivität von ribosomalen Untereinheiten	43
4.7.2.1	Isolierung ribosomaler 60S- und 40S-Untereinheiten	49

4.7.2.2	Aktivitätstest im PolyU-System	53
4.7.2.3	Autodegradation ribosomaler Untereinheiten	54
4.7.3	Temperaturabhängigkeit	57
4.7.4	Abbau von PolyU	57
4.7.5	PolyU-Degradation im zellfreien System	58
5.	<u>DISKUSSION</u>	61
5.1	Polyribosomenisolierung	61
5.2	Polyribosomen-abhängiges System	62
5.3	Vergleich der optimalen Ionenbedingungen für die zellfreie mRNS- und Proteinsynthese	63
5.4	Isolierung von Polyribosomen aus Schizosaccharomyces pombe nach Induzierung der sauren Phosphatase	65
5.5	Ribosomale Ribonukleasen	67
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	71



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Arbeiten umfassen den Aufbau eines zellfreien Polyribosomen-abhängigen Protein-synthetisierenden Systems und Untersuchungen über ribosomale Ribonukleasen.

Im ersten Teil der Arbeit wird eine Methode zur Isolierung von Polyribosomen aus *Saccharomyces* beschrieben, die sich von den bekannten Verfahren (Lysis der Sphaeroplasten) durch die Verwendung der French-Press zum Aufschluß der Zellen unterscheidet. Aus verschiedenen Wachstumsphasen geerntete Zellen zeigten einen unterschiedlichen Polyribosomengehalt. Spätlogarithmische Hefen ergaben die höchste Polyribosomenausbeute. Die Polyribosomen wurden mit Sedimentationsanalysen, Ribonuklease-Behandlung sowie KCl-Dissoziation charakterisiert und ihre biologische Aktivität im zellfreien System geprüft.

Im optimierten Translationssystem waren die Polyribosomen zur Reinitiation der Proteinbiosynthese befähigt. Dies konnte durch Hemmung des Aminosäureeinbaus mit Aurintricarboxylic Acid, Edeine und Natriumfluorid nachgewiesen werden. Das Polyribosomen-abhängige System wurde u. a. für vergleichende Untersuchungen über die Ionenbedingungen von Transkription und Translation, in Hinblick auf die Erstellung eines gekoppelten DNS-abhängigen Protein-synthetisierenden Systems, entwickelt. Es hat sich gezeigt, daß die Translation bei einer optimalen Konzentration von 6 mM $MgCl_2$ durch Manganionen, die für die Transkription essentiell sind, stark gehemmt wurde. Erfolgte die Inkubation mit 2 mM und 3 mM $MgCl_2$, konnte ein maximaler Aminosäureeinbau bei 2 mM bzw. 1.5 mM $MnCl_2$ beobachtet werden. Diese Maxima lagen aber 50 % bzw. 75% unter der Syntheserate des Mangan-freien Ansatzes. Während die optimale KCl-Konzentration mit 50 mM erreicht wurde, war mit Ammoniumsulfat eine Inhibition zu verzeichnen.

Neben diesen Untersuchungen sollte das Polyribosomen-abhängige System auch zur in vitro-Synthese spezifischer Enzyme herangezogen werden. Es wurden nach Induzierung der sauren Phosphatase von *Schizosaccharomyces pombe* Polyribosomen isoliert und im zellfreien System translatiert. Zwar konnte ein Aminosäureeinbau gemessen werden, aber der Nachweis vom in vitro synthetisierten Enzym gelang nicht.

Der zweite Abschnitt der Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen über ribosomale Ribonukleasen. Es wurde eine Autodegradation der Polyribosomen bei Magnesiummangel beobachtet, die auf die Wirkung einer in der 40S-Untereinheit lokalisierten Ribonuklease zurückgeführt werden konnte. Dieses Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 60°C. Ein Abbau von PolyU konnte weder unter Autodegradationsbedingungen noch im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese im zellfreien System festgestellt werden.

2. EINLEITUNG

Die Entwicklung von zellfreien Protein-synthetisierenden Systemen zusammen mit genetischen Studien führten zu der Aufklärung des genetischen Codes [1] und gaben einen Einblick in den Mechanismus der Proteinbiosynthese [2-5]. Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich an Prokaryonten vorgenommen, die aufgrund ihrer relativ geringen genetischen Information, der kurzen Generationszeit und ihrer einfachen zellulären Struktur geeignete Modellobjekte sind, Während das Prinzip der Genexpression bei Prokaryonten und Eukaryonten übereinstimmt, wurden jedoch für den Bereich der Transkription als auch auf der Ebene der Translation eine Anzahl von Unterschieden gefunden.

Einen wesentlichen Einfluß auf den Informationsfluß von der DNS zum Protein hat bei Eukaryonten die Kompartimentierung der Zelle, die eine Trennung von Transkription und Translation bedingt und damit einen Transport der mRNA vom Kern zum Zytoplasma notwendig macht. Mit dem Transport ist ein Reifungsprozeß der mRNA verbunden, der wahrscheinlich für die Regulation der Proteinbiosynthese von Bedeutung ist [6]. Im Gegensatz zu dem von Jacob und Monod [7] entwickelten Modell der Regulation der Genexpression bei Bakterien werden in dem von Scherrer und Marcaud [8] vorgeschlagenen Kaskadenmodell mögliche Orte für die Regulation in der Eukaryontenzelle auf der Ebene der Transkription, des mRNA-Prozessing und der Translation gefordert. An diesen Prozessen können Enzyme und Proteinfaktoren beteiligt sein, aber auch eine Regulation über unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Kern und Zytoplasma ist denkbar. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß z. B. für die mRNA-Synthese insbesondere Manganionen [9], für die Proteinsynthese dagegen Magnesiumionen [10] benötigt werden.

Während die zellfreie gekoppelte DNS-abhängige Proteinbiosynthese in *E. coli*-Systemen mit Phagen - [11] und mitochondrialer Hefe-DNS [12] bereits gelang, konnten noch keine vergleichbaren Systeme aus Eukaryontenzellen entwickelt werden. Zwar wurden Transkriptionssysteme z.B. mit Hefe-DNS [13] oder Hefe-Chromatin [14] beschrieben und natürliche mRNS aus spezialisierten Zellen wie Retikulozyten [15-18], Augenlinsenzellen [19], Oozyten [20, 21] und Muskelzellen [22] in zellfreien Systemen translatiert, aber die Kopplung von Transkription und Translation *in vitro* wurde bisher noch nicht vollzogen. Die Schwierigkeiten, die bei der Entwicklung von gekoppelten DNS-abhängigen Systemen entstehen, resultieren aus der hohen Komplexität und den damit verbundenen Regulationsmechanismen der Eukaryontenzelle.

Der Aufbau zellfreier Systeme in unserer Arbeitsgruppe diente u.a. für Untersuchungen über die Wirkung des photodynamischen Effekts von Thiopyronin auf die Proteinbiosynthese [23-25]. Es wurden Hefe-Systeme verwendet, die entweder Polyuridylsäure (PolyU) [26-28] oder Kalbsthymus-DNS [26] als Träger der genetischen Information enthielten. Es hat sich aber gezeigt, daß der komplizierte Ablauf der Genexpression mit diesen Systemen nicht nachvollzogen werden konnte. Um die optimalen Bedingungen der *in vitro* mRNS- und Proteinsynthese testen und vergleichen zu können, mußten für die Transkription und Translation Teilsysteme entwickelt werden. Außerdem war es notwendig mRNS-Vorstufen und mRNS aus dem Kern und dem Zytoplasma zu isolieren und zu charakterisieren, um Aussagen über das mRNS-Prozessing machen zu können [29]. Nach Abschluß dieser Untersuchungen wird es erst möglich sein, ein funktionsfähiges zellfreies DNS-abhängiges Protein-synthetisierendes System aufzubauen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein durch endogene mRNS gesteuertes zellfreies Protein-synthetisierendes System beschrieben, mit dem ver-

gleichende Untersuchungen über die optimalen Ionenbedingungen von Transkription und Translation durchgeführt wurden, um die Frage zu klären, ob und unter welchen Bedingungen die Entwicklung eines DNS-abhängigen Systems möglich ist. Außerdem wurde der Versuch unternommen, nach Induzierung der sauren Phosphatase aus *Schizosaccharomyces pombe* isolierte Polyribisomen in dem zell-freien System zur Synthese dieses Enzyms einzusetzen.

Stärk und Jaenicke [30] haben an Hefe-Ribosomen assoziierte Ribonuklease-Aktivität gefunden. Es war zu prüfen, ob in Hefen eine Ribonuklease an die Ribosomen gebunden ist oder nur unspezifisch während der Homogenisation der Zellen assoziiert wird. Darüberhinaus wurde der Einfluß ribosomaler Ribonukleasen auf die Translation untersucht und mit der Ribonuklease V aus *E.coli* verglichen [31].

Voraussetzung für diese Arbeit war die Entwicklung einer einfachen Methode, mit der aus Hefen aktive Polyribosomen isoliert werden können. Hefe, ein einzelliger Eukaryont, wurde als Versuchsobjekt gewählt, da er alle Merkmale von Zellen höher entwickelter Organismen besitzt, sich aber durch seine einfache Handhabung und durch eine Vielzahl zur Verfügung stehender Stämme mit speziellen Mutanten auszeichnet.

An einigen Beispielen konnte die Übereinstimmung zwischen Hefen und Zellen höherer Organismen bewiesen werden. Udem und Warner [32] sowie Retel und Planta [33] konnten zeigen, daß die Synthese von ribosomaler RNS bei Hefen nach dem gleichen Prinzip wie bei anderen Eukaryonten abläuft. Außerdem wurden übereinstimmend mit tierischen Zellen mehrere DNS-abhängige RNS-Polymerasen gefunden [34]. Und auch die für diese Zellen typischen PolyA-Sequenzen an den 3'-OH-Enden der HnRNS [35] und mRNS [36, 37] wurden in Hefen nachgewiesen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Firma Merck [Darmstadt]:

Trishydroxymethylaminomethan (Tris), Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumjodid (KJ), Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Ammoniummolybdat, Calciumchlorid (CaCl_2), Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Magnesiumchlorid (MgCl_2), Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$), Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$), Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), EDTA-Titriplex III, Salzsäure (HCl), Eisessig (CH_3COOH), Kaliumhydroxyd (KOH), Glycerin, Natriumacetat (CH_3COONa), Natriumfluorid (NaF), Natriumazid (NaN_3), p-Nitrophenylphosphat, Uranylacetat, Äthylenglykol, Naphthalin, Trichloroessigsäure (TCA), Perchlorsäure (PCA), Calciumpanthothenat, Nikotinsäure, Biotin, Inositol, Pepton.

Firma Serva [Heidelberg]:

Saccharose, Adenosintriphosphat (ATP), Guanosintriphosphat (GTP), Brij 58, Cycloheximid, Chloramphenicol, 2-Mercaptoäthanol, Ammoniumsulfat.

Firma Boehringer-Mannheim:

Phosphoenolpyruvat (PEP), PEP-Kinase, Polyuridylsäure (PolyU), tRNS, Ribonuklease A.

Firma Sigma [St. Louis, USA]:

Aurin Tricarboxylic Acid (ATA).

Firma Calbiochem [San Diego, USA]:

Edeine

Firma New England Nuclear Chemicals [Boston, Mass., USA]:

^3H -Polyuridylsäure, Omnifluor

Firma Isotopen Dienst West [Sprendlingen]:

^{14}C -Aminosäuregemisch, ^{14}C -Phenylalanin, 2- ^{14}C -Uracil

Firma Schleicher und Schüll [Dassel]:

Selectron Glasfaserfilter Typ GF 92

Difco [Detroit, USA]:

Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base

1.2

Geräte

Christ-Kühlzentrifuge Universal Junior IKS

Kühlzentrifuge Sorvall Superspeed RC 2-B

Ultrazentrifuge Beckman Spinco L2-65B

Bio-Dynamics Select-a-Fuge 24

Homogenisator Kobold Fa. Braun, Melsungen

French-Press, Amicon

Kolorimeter nach Dr. B. Lange (MJ) mit Grünfilter

Spektralphotometer Beckman DB-GT

Scintillationszähler Beckman LS-233

Fraktionssammler Gilson

3.1.3 Medien

Vollmedium: 20 g Glukose, 10 g Difco-Yeast Extrakt und 5 g Pepton wurden in einem Liter entnimeralisiertem Wasser gelöst.

GYNP: 20 g Glukose, 10 g Yeast Nitrogen Base und 5 g Pepton wurden in einem Liter entmimeralisiertem Wasser gelöst. Außerdem enthielt das Medium 1 mM Kaliumphosphat.

EMM:

Salzlösung: 100 g NH_4Cl , 20 g Na-Acetat, 20 g KCl , 2.5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g CaCl_2 und 20 ml einer Lösung mit Spurenelementen (500 mg H_3BO_3 , 40 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 100 mg KJ , 400 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 530 mg $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 500 mg NH_4 -Molybdat und 400 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ in 1 Liter H_2O) wurden mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Das Medium enthielt 20 g Glukose, 50 ml Salzlösung, 1 ml Basisvitamine (1 g Inositol, 1g Nikotinsäure und 0.1 g Calciumpanthothenat in 100 ml H_2O) und 1 ml Biotin im Endvolumen von einem Liter (destilliertes Wasser).

3.1.4 Stämme

Es wurden folgende Saccharomyces-Stämme: 211 (diploid [38], R XII (diploid) [39], 2200 (tetraploid) [40], 1000 (haploid) [40] und der Schizosaccharomyces pombe Stamm 975 (diploid) [41] verwendet,

3.1.5 Radioaktive Lösungen

^3H -Polyuridylsäure	10 $\mu\text{Ci/ml}$	(H_2O / Äthanol, 1 : 1)
2- ^{14}C -Uracil	40 Ci/Mol	
^{14}C -Aminosäuren	5 $\mu\text{Ci/ml}$	ca. 100 Ci/Mol, (Tris-HCl, pH 7.5)
^{14}C -Phenylalanin (DL)	5 $\mu\text{Ci/ml}$	50 Ci/Mol, (Tris-HCl, pH 7.5)

3.1.6 Puffer

Puffer:	A	B	C	D	E
Tris-HCl (mM)	30	30	30	30	100
pH	7.5	7.5	7.5	7.5	8.0
KCl (mM)	200	50	50	50	50
MgCl_2 (mM)	5	5	5	1	5
EDTA (mM)	0.25	0.25	0.25	0.05	0.25
2-Mercapto-ethanol (mM)	6	6	6	10	10
Saccharose (mM)	500	-	-	-	-
Glycerin % (v/v)	20	-	20	10	20

3.2 Methoden

3.2.1 Aufzucht der Hefen

Zur Aufzucht der Hefen wurden 5 Liter Vollmedium mit 2 ml einer 24-36 h alten Vorkultur beimpft. Die Hefen wuchsen bei 30°C unter ständigem Rühren aber ohne zusätzliche Belüftung innerhalb von ca. 15 h bis zu einer Trübung von 0,5 OD_{525 nm} (Lange Kolorimeter). Das Ernten erfolgte nach Zugabe von Eis durch abzentrifugieren in einer Christ-Kühlzentrifuge. Die Hefen wurden dreimal mit Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂) gewaschen. Die Ausbeute betrug ca. 40 g Feuchtmasse.

Für die Herstellung von "Natriumazid" - Ribosomen wurden die Hefen vor dem Ernten 15 min mit 1 mM NaN₃ inkubiert. Sollten Hefen mit radioaktiv markierter RNS gezüchtet werden, wurden mit der Vorkultur 100 µCi 2-¹⁴C-Uracil zu dem Vollmedium (5 l) gegeben.

Zum Induzieren der sauren Phosphatase von *Schizosaccharomyces pombe* wurden Hefen in 0.8 ml Vorkultur zu 1 Liter GYNP-Medium (oder Vollmedium mit 1 mM Phosphat, pH 7.0) gegeben, bei 30°C mit Belüftung inkubiert und bei einer Trübung von 0.25 OD_{525 nm} geerntet. Die Hefen wurden mit Puffer gewaschen und in 5 Liter EM-Medium [42] resuspendiert. Geerntet wurde nach ca. 2 h, wenn eine Zunahme der Enzymaktivität festgestellt werden konnte.

3.2.2.1 Isolierung von Polyribosomen

15 g Hefezellen (Feuchtmasse) wurden mit Puffer A auf 40 ml aufgefüllt, 30 min bei 20°C inkubiert und in einer French-Press-Zelle mit einem Gemisch aus Trockeneis und Äthanol eingefroren. Danach wurden die Hefen mit einem Druck von 20 000 pSi durch eine Kanüle

mit 1.4 mm Innendurchmesser gepreßt. Die Isolierung der Polyribosomen erfolgte in Anlehnung an die von Falvey and Staehelin [43] beschriebene Methode. Das Homogenat wurde 10 min mit $18\,000 \times g$ zentrifugiert. Zu dem postmitochondrialen Überstand wurde Brij 58 (Endkonzentration 1%) gegeben, bevor er (20 ml) auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten von 1.8 M (8 ml) und 1 M (8ml) (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 6 mM Mercaptoäthanol, 0.25 mM EDTA) geschichtet und in einem SW 27 Rotor 18 h mit $131\,000 \times g$ ($0^\circ C$) zentrifugiert wurde. Der gesamte Überstand wurde abgesaugt, der Niederschlag mit destilliertem Wasser gespült und in Puffer B gelöst. Die Polyribosomensuspension wurde auf eine optische Dichte von 200 - 400 $OD_{260\text{ nm}}/\text{ml}$ eingestellt und bei $-25^\circ C$ aufbewahrt. Die Ausbeute betrug 3-5 mg Polyribosomen/g Hefe-Feuchtmasse.

2.2.2 Isolierung von "NaN₃" - Ribosomen

10 bis 15 g mit Natriumazid inkubierte Hefen wurden mit Puffer C auf 40 ml aufgefüllt, 15 min bei $0^\circ C$ inkubiert und in einer French-Press-Zelle eingefroren (siehe Kap. 3.2.2.1). Nach dem Pressen wurde das Homogenat 10 min mit $48\,000 \times g$ zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Ribosomen mit $251\,000 \times g$ im 60 Ti Rotor (2h/50 000 Upm) niedergeschlagen, in Puffer B gelöst und nochmals abzentrifugiert. Die Ribosomensuspension wurde auf eine optische Dichte von 200-400 $OD_{260\text{ nm}}/\text{ml}$ eingestellt und in Puffer B mit 10% Glycerin bei $-25^\circ C$ aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ca. 35 mg Ribosomen/g Hefe-Feuchtmasse.

3.2.3 Isolierung von ribosomalen 60S- und 40S-Untereinheiten

Ribosomale Untereinheiten können aus "Run off"-Ribosomen und " NaN_3 "-Ribosomen gewonnen werden. Zur Herstellung von "Run off"-Ribosomen wurden Polyribosomen 30 min (40 min) unter Bedingungen der zellfreien Proteinbiosynthese mit 0.5 mM Puromycin (ohne Puromycin) in einem 9 ml Ansatz inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml 2 M KCl, pH 7.5, gestoppt. Je 2 ml wurden auf einen 15-30% (10-30%) Saccharosegradienten (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM KCl, 3 bzw. 5 mM MgCl_2 , 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 0.25 mM EDTA) geschichtet und 8 h (6 h) mit $131\,000 \times g$ bei 15°C im SW 27 Rotor zentrifugiert. Nach dem Fraktionieren der Gradienten wurden die Untereinheiten gesammelt, im 60 Ti Rotor mit $251\,000 \times g$ ($50\,000 \text{ Upm} / 6\text{h}$) niedergeschlagen und in Puffer B resuspendiert. Die 60S- Untereinheiten wurden auf eine optische Dichte von $300 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} / \text{ml}$ und die 40S-Untereinheiten auf $100 \text{ OD}_{260 \text{ nm}}$ pro ml eingestellt.

200 bis $300 \text{ OD}_{260 \text{ nm}}$ Einheiten " NaN_3 "-Ribosomen wurden direkt, ohne Vorinkubation, auf einen 15-30% Saccharosegradienten (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 0.25 mM EDTA) aufgetragen und 8 h mit $131\,000 \times g$ bei 15°C zentrifugiert. Die Untereinheiten wurden, wie oben beschrieben, gesammelt.

3.2.4 Isolierung von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren

12 g Hefe-Feuchtmasse wurden mit Puffer E auf 40 ml aufgefüllt, 30 min bei 20°C inkubiert und in einer French-Press-Zelle eingefroren. Nach dem Pressen wurde das Homogenat 10 min mit $18\,000 \times g$ zentri-

fugiert. Der postmitochondriale Überstand wurde 3 h mit 251 000 x g (60 Ti/50 000 Upm) zentrifugiert. Aus der mit Puffer E auf 50 ml aufgefüllten Ribosomen-freien Lösung wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Fraktion der zwischen 30 und 70% (Sättigung) gefällten Proteine wurden zentrifugiert (10 min mit 30 000 x g), der Niederschlag in 10 ml Puffer D gelöst und über Nacht gegen 2 x 2.5 Liter Puffer D dialysiert. Grobe Verunreinigungen wurden durch zentrifugieren mit 18 000 x g (10 min) entfernt. Nach dem Mischen mit Glycerin (Endkonzentration 50%) konnte die Enzymlösung bei -15°C aufbewahrt werden. Sie enthielt Aminoacyl-tRNS-Synthetasen, tRNS und für die Proteinbiosynthese essentielle Faktoren.

2.5 Sedimentationsanalysen

Die Sedimentationsanalysen von Polyribosomen, 80S-Ribosomen, 60S- und 40S-Untereinheiten wurden mit Saccharosegradienten im SW 27 Rotor durchgeführt. Die Gradienten wurden in ca. 30 Fraktionen von ungefähr 1,2 ml fraktioniert, in denen dann die optische Dichte ($OD_{260\text{ nm}}$) oder die Radioaktivität bestimmt wurde. Polyribosomen wurden in linearen 20-45% Gradienten (Puffer B) 5 h mit 131 000 x g zentrifugiert. Sollten Polyribosomen, 80S-Ribosomen und Untereinheiten voneinander getrennt werden, so erfolgte die Sedimentation in einem linearen 5-50% Gradienten in 16 h mit 46 000 x g (16 000 Upm). Für die Sedimentation von ribosomalen Untereinheiten waren lineare und isokinetische Gradienten [44] (Puffer mit 500 mM KCl) geeignet. Lineare 10-30% oder 15-30% Gradienten wurden 6-8 h und isokinetische Gradienten 5-6 h mit 131 000 x g (27 000 Upm) zentrifugiert.

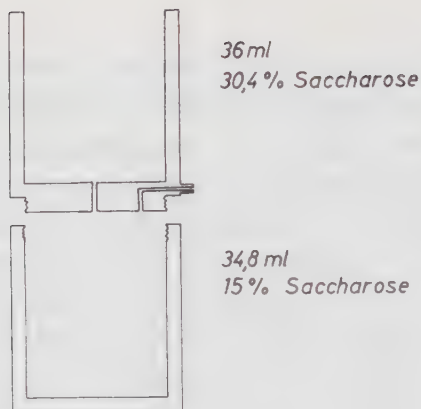


Abb. 1:

Gradientenmischer für isokinetische Gradienten.
Der Gradientenmischer wurde von H. Posorski gebaut
[Werkstatt Freie Universität Berlin, Zentralinstitut,
Haus V].

3.2.6 Inkubationsbedingungen für zellfreie Systeme

3.2.6.1 Polyribosomensystem

Für die zellfreie Proteinbiosynthese erfolgte die Inkubation in 100 μ l Ansätzen bei 30°C für 60 min.

Konzentrationen im Ansatz:

1-5 mg/ml	Polyribosomen
0,2-0,5 mg/ml	Enzyme (tRNS)
5 μ g/ml	PEP-Kinase
1 μ Ci/ml	¹⁴ C-Aminosäuren
30 mM	Tris-HCl, pH 7.5
50 mM	KCl
6 mM	MgCl ₂
6 mM	2-Mercaptoäthanol
1.5 mM	ATP
0.3 mM	GTP
3.0 mM	PEP

3.2.6.2 PolyU-System

Die Inkubation für das PolyU-System wurde ebenfalls in 100 μ l-Ansätzen bei 30°C für 60 min durchgeführt.

Konzentrationen im Ansatz:

ca. 3 mg/ml	60S-Untereinheiten
ca. 1 mg/ml	40S-Untereinheiten
oder ca. 4 mg/ml	80S-Ribosomen
0.2-0.3 mg/ml	Enzyme (tRNS)
0.5 mg/ml	PolyU
5 μ g/ml	PEP-Kinase
1 μ Ci/ml	¹⁴ C-Phenylalanin
30 mM	Tris-HCl, pH 7.5
50 mM	KCl
10 - 14 mM	MgCl ₂
6 mM	2-Mercaptoäthanol
1,5 mM	ATP
0.3 mM	GTP
3.0 mM	PEP

3.2.7 Ribonuklease - Bestimmung

3.2.7.1 Autodegradation von Polyribosomen

2-¹⁴C-Uracil markierte Polyribosomen wurden mit ATP oder EDTA verschiedene Zeiten bei 35°C inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 % TCA (0°C) wurden die nicht degradierten Ribonukleinsäuren an Glasfaserfilter adsorbiert und ihre Radioaktivität bestimmt (siehe Kap. 3.2.9).

Die Menge des säurelöslichen Materials wurde aus der Differenz zum 0 min - Wert bestimmt.

Der Inkubationsansatz enthielt:

4.5 mg/ml	Polyribosomen (^{14}C -Uracil)
0-10 mM	ATP oder EDTA
30 mM	Tris-HCl, pH 7.5
50 mM	KCl
6 mM	MgCl_2
6 mM	2-Mercaptoäthanol

3.2.7.2 Autodegradation von ribosomalen Untereinheiten

Zur Bestimmung der Autodegradation von 60S- und 40S-Untereinheiten wurde mit EDTA bei 35°C inkubiert. Aus einem Ansatz von 100 μl wurden zu verschiedenen Zeiten 18 μl entnommen und zu 80 μl eiskaltem 25% Perchlorsäure/0.75% Uranylacetat-Gemisch [45] pipettiert. Die Proben wurden mit 900 μl H_2O verdünnt und 5 min mit 5 400 x g zentrifugiert (Bio-Dynamics Select-a-Fuge 24). Durch Messung der optischen Dichte (bei 260 nm, gegen eine Kontrolle) im Überstand wurde das säurelösliche Material bestimmt.

Der Inkubationsansatz enthielt:

7.5 mg/ml	60S-Untereinheiten
oder 7.5 mg/ml	40S-Untereinheiten
10 mM	EDTA
30 mM	Tris-HCl, pH 7.5
50 mM	KCl
6 mM	MgCl_2
6 mM	2-Mercaptoäthanol

3.2.7.3 Degradation von künstlicher mRNS (PolyU)

Der Abbau von künstlicher mRNS (^3H -PolyU) wurde unter Autodegradationsbedingungen oder unter Proteinbiosynthese-Bedingungen bestimmt (siehe PolyU-System). Der Inkubationsansatz enthielt $0.2 \mu\text{Ci/ml } ^3\text{H-PolyU}$. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 5 % TCA wurden die nicht degradierten Ribonukleinsäuren an Glasfaserfilter adsorbiert und ihre Radioaktivität bestimmt.

3.2.8 Saure Phosphatase - Test

Die saure Phosphatase wurde nach der Methode von Torriani [46] bestimmt. 1.5×10^7 Zellen (= 1 ml einer Hefesuspension von $0.16 \text{ OD}_{525 \text{ nm}}/\text{ml}$) wurden in 2 ml Acetatpuffer (0.5 M NaCOOH, pH 4.3) resuspendiert, mit 0.2 ml p-Nitrophenylphosphat (15 mM) gemischt und bei 30°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden 0.2 ml Proben entnommen und zu 1 ml Stop - Puffer (0.5 M NaOH, 0.5 M NaH_2PO_4) pipettiert. Im Spektralphotometer wurde die Extinktionsänderung bei 405 nm gegen H_2O gemessen.

3.2.9 Messung der Radioaktivität

Nachdem die Reaktion mit 5 % TCA gestoppt war, wurden die Proben 15 min auf 90°C erhitzt, um aminoacylierte tRNS zu zerstören (Polyribosomen- und PolyU-System), oder die Niederschläge wurden direkt nach dem Reaktionsstop (Ribonuklease-Test) an Glasfaserfilter adsorbiert. Die Filter wurden mit 5% TCA sowie Äther/Äthanol (1:1) gewaschen, getrocknet und zu 5 ml Scintillationsmix (4 g Omnifluor/1 l Toluol) gegeben. Die Radioaktivität wurde mit 90% Zählausbeute gemessen.

Zur Bestimmung der 2-¹⁴C-Uracil markierten Polyribosomen nach den Sedimentationsanalysen wurden die 1.2 ml Fraktionen mit 0.5 ml H₂O verdünnt und davon 0.5 ml mit 5 ml Bray's Lösung gemischt.

Bray's Lösung: 60 g Naphthalin, 4 g Omnifluor, 20 ml Äthylen-glykol und 100 ml Methanol mit Dioxan auf 1 000 ml aufgefüllt.

ERGEBNISSE

Isolierung und Charakterisierung von Polyribosomen

Polyribosomenisolierung

Der Aufschluß von Hefezellen mit der French-Press ist eine schonende Methode, die es erlaubt, so fragile Zellkomponenten wie Kerne [47, 48] und Polyribosomen zu isolieren. Dieses Verfahren hat gegenüber der Herstellung und Lysis von Sphaeroplasten [49-51] den Vorteil, daß es von den Wachstums- und Inkubationsbedingungen sowie von den Eigenschaften des Hefestammes unabhängig ist. Polyribosomen wurden aus Zellen der *Saccharomyces*-Stämme 211 (diploid), R XII (diploid), 2200 (tetraploid), 1000 (haploid) und aus dem *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 975 (diploid) isoliert, ohne daß Unterschiede in der Qualität oder Quantität festgestellt werden konnten.

Die Zellen wurden vor dem Homogenisieren in Puffer A aufgenommen und 30 min bei 20°C inkubiert. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, sind nur frische Zellen für die Polyribosomenisolierung geeignet, da ein Einfrieren und Auftauen der Hefen vor der Inkubation zur weitgehenden Zerstörung der Polyribosomen führt.

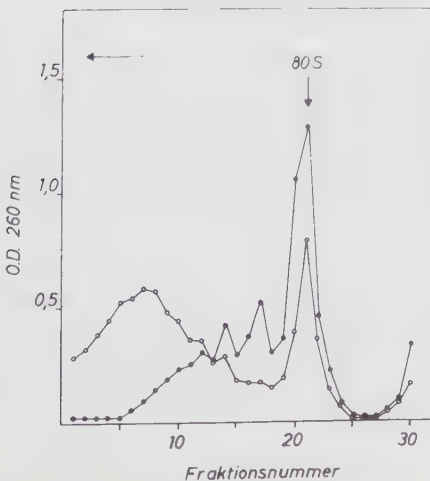


Abb. 2:

Sedimentationsanalyse
von Polyribosomen aus
frischen ○—○
und tiefgefrorenen ●—●
Hefen.

Um die Bildung von unspezifischen Polyribosomen-Protein-Komplexen zu verhindern, wurde zur Isolierung ein Puffer mit hoher Salzkonzentration (200 mM KCl) gewählt. Zur Anreicherung der Polyribosomen wurde der postmitochondriale Überstand auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet und 18 h mit $131\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Niederschlag enthielt bis zu 95 % freie und mit Brij 58 von Membranen abgelöste Polyribosomen.

Ihr Anteil an der gesamten Ribosomenmenge betrug aber nur ca. 15 %.

4.1.2 Polyribosomengehalt in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Es ist bekannt, daß der physiologische Zustand der Hefezellen von der Wachstumsphase abhängt. Lucas et al [52], Dietz et al. [53] sowie Uttech [26] haben gezeigt, daß Ribosomen aus der log-Phase die höchste biologische Aktivität besitzen. Deshalb war es unerlässlich auch den Einfluß der Wachstumsphase auf den Polyribosomengehalt der Hefezellen zu untersuchen. Das Verhältnis von Polyribosomen/Monoribosomen ist ein geeignetes Maß für den relativen Polyribosomengehalt. Aus Sedimentationsanalysen wurde das Verhältnis von Polyribosomen ($OD_{260\text{ nm}}$ der Fraktionen 1 bis 17) zu Monoribosomen ($OD_{260\text{ nm}}$ der Fraktionen 21 bis 23) bestimmt. Unterschiede in der Verteilung innerhalb des Polyribosomenbereichs wurden durch Gewichtung der Polyribosomenfraktionen berücksichtigt. Schwere Polyribosomen wurden gegenüber leichten stärker gewichtet. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, ist der Polyribosomenanteil während der späten log-Phase am höchsten. Dagegen überwiegt der Anteil der Monoribosomen besonders stark in der stationären Phase. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Rock und Johnson [54], die nachweisen konnten, daß stationäre Zellen die höchste RNase-

Aktivität haben, aber einen niedrigen RNS-Gehalt besitzen.

Eine ähnliche Abhängigkeit von der Wachstumsphase ist auch bei der Polyribosomenausbeute zu beobachten (Abb. 4). Während aus spätlogarithmischen Zellen 3,1 bis 3,6 mg Polyribosomen/g Hefe (Feuchtmasse) erhalten wurden, beträgt die Ausbeute bei Zellen aus der stationären Phase nur 0,3 mg Polyribosomen/g Hefe (Feuchtmasse).

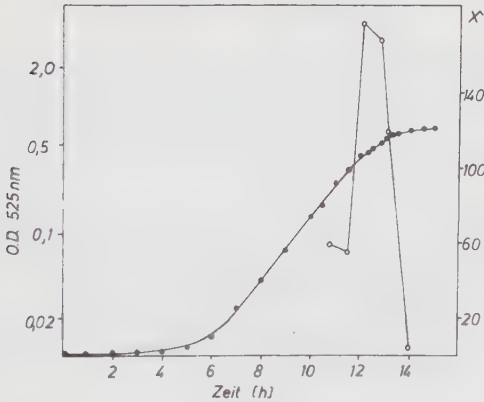


Abb. 3:

Polyribosomengehalt von Hefezellen Stamm 211 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Polyribosomen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und 5 h mit 131 000 x g im SW 27 Rotor sedimentiert (20-45% Saccharosegradient). Aus den Sedimentationsprofilen wurde der Anteil von Polyribosomen (Fraktion 1 bis 17) und Monoribosomen (Fraktion 21 bis 23) bestimmt.

$$X = \frac{\sum_{n=1}^{n=18} \text{OD } 260 \text{ nm} \times (18 - n)}{\sum_{n=21}^{n=23} \text{OD } 260 \text{ nm}}$$



Wachstumskurve Stamm 211 (OD 525 nm)

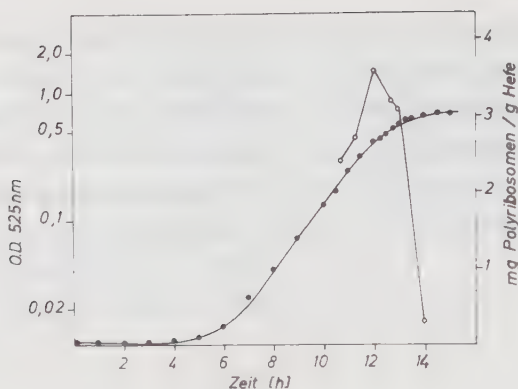


Abb. 4:

Abhängigkeit der Polyribosomenausbeute von der Wachstumsphase. Polyribosomen wurden, wie in Material und Methoden angegeben, isoliert. ○—○ mg Polyribosomen/g Hefe (Feuchtmasse), ●—● Wachstumskurve (OD_{525 nm}).

4.1.3

Ribonuklease-Sensitivität der Polyribosomen

Für den Nachweis von Polyribosomen wurden Sedimentationsanalysen, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Da bekannt ist, daß Polyribosomen Ribonuklease-sensitiv sind [55, 56], wurde eine Inkubation mit niedriger Ribonuklease-Konzentration vorgenommen. Abb. 5 zeigt ein typisches Polyribosomenprofil. Nach 10 min Inkubation bei 35°C nimmt der Anteil schwerer Polyribosomen zugunsten von Oligoribosomen und Monoribosomen ab. Mit 0.2 µg Ribonuklease/ml inkubierte Polyribosomen wurden vollständig zu Monoribosomen abgebaut.

Die in Kap. 4.1.4 und 4.3 beschriebene biologische Aktivität und die Dissoziation in ribosomale 60S- und 40S-Untereinheiten (Kap. 4.7.2.1) sowie die Inkorporation von 2-¹⁴C-Uracil (Kap. 4.7.1) sind weitere Beweise dafür, daß es sich bei dem isolierten Material um Polyribosomen handelt.

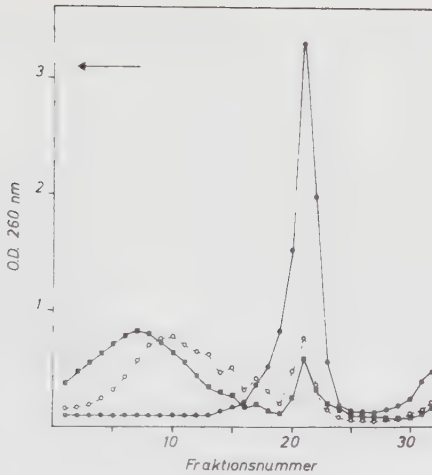


Abb. 5:

Sedimentation RNase-behandelter Polyribosomen. Polyribosomen wurden mit $0.2 \mu\text{g RNase/ml}$ 10 min bei 35°C inkubiert. Die Sedimentation wurde 5 h mit $131\,000 \times g$ im SW 27 Rotor durchgeführt (20-45% Saccharosegradient).

■—■ nicht inkubierte Polyribosomen,
○- - -○ ohne RNase inkubiert, ●—● mit RNase
inkubiert.

4.1.4

Nachweis von wachsenden Polypeptidketten an Polyribosomen

Werden Polyribosomen im zellfreien System inkubiert und dann sedimentiert, so sind wachsende Polypeptidketten an Polyribosomen und Monoribosomen zu erkennen (Abb. 6). Die Zunahme der markierten Peptide im Monoribosomenbereich deutet darauf hin, daß ein Teil der synthetisierten Peptide nicht von den Ribosomen entlassen wurde. Der gleiche Effekt wurde auch von Mager und Planta [57] beschrieben.

Zum Nachweis von freien Polypeptidketten wurden die Ribosomen nach der Inkubation abzentrifugiert. In dem Überstand waren dann nach 40 min ca. 20% und nach 80 min ca. 40% des säureunlöslichen Materials enthalten.

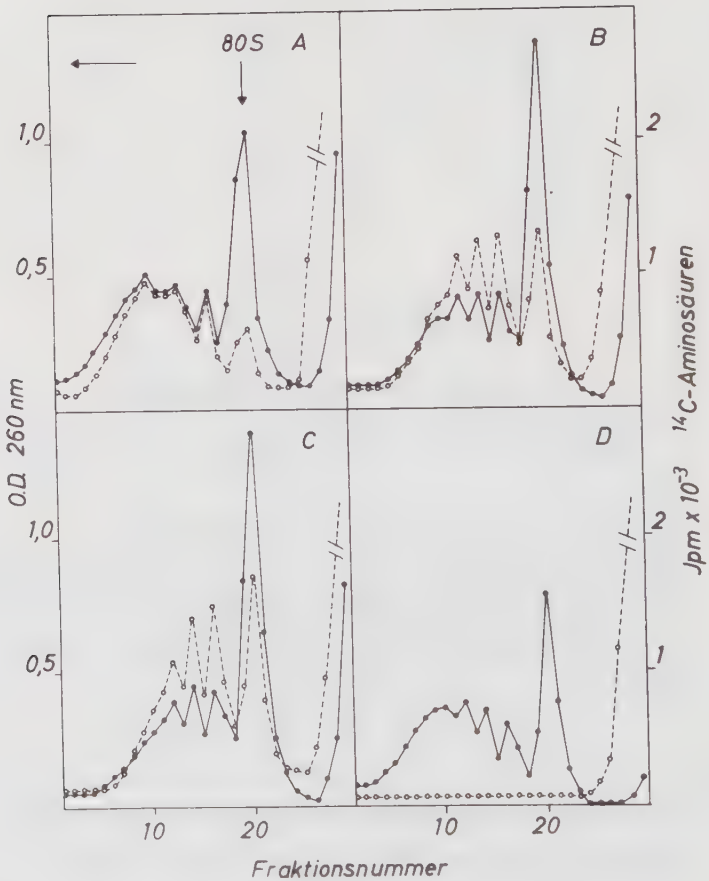


Abb. 6:

In vitro Synthese von Polypeptiden an Polyribosomen. Polyribosomen wurden im zellfreien System 10, 30 und 50 min inkubiert (Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden) und anschließend 5 h mit $131\,000 \times g$ im SW 27 Rotor sedimentiert (20-45% Saccharosegradient). A, 10 min; B, 30 min; C, 50 min; D 50 min ohne ATP, GTP, PEP und PEP-Kinase.

●—● OD_{260 nm}, ○----○ ^{14}C -Aminosäuren.

4.2 Isolierung von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren

Zur Isolierung von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren wurden die Hefen ebenfalls mit der French-Press aufgeschlossen. Es war aber erforderlich, einen Puffer (E) mit höherer Pufferkapazität (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) zu verwenden, da nach dem Homogenisieren der Zellen mit Puffer niedriger Kapazität (30 mM Tris-HCl, pH 7.5) pH-Verschiebungen in den sauren Bereich von 1 bis 1,5 Einheiten zu beobachten waren [28]. Durch eine Ammoniumsulfatfällung des postribosomalen Überstands und eine anschließende Dialyse gegen Puffer D wurde eine für das Polyribosomen-abhängige System ausreichend gereinigte Enzymfraktion gewonnen. Außer Aminoacyl-tRNS-Synthetasen sind in dem Ribosomen-freien Überstand auch Initiations- und Elongationsfaktoren enthalten.

Die Initiationsfaktoren können von Ribosomen mit hohen Salzkonzentrationen abgewaschen werden [58]. Gleichzeitig werden aber auch unspezifisch gebundene Proteine abgelöst. Deshalb war zu prüfen, ob durch hohe Salzkonzentrationen im Homogenisationspuffer eine Anreicherung des Ribosomen-freien Überstandes mit Initiationsfaktoren und damit eine Stimulierung der Proteinbiosynthese in vitro möglich ist. Wie aus Abb. 7 und 8 zu ersehen ist, wurden durch eine Erhöhung der KCl-Konzentrationen im Homogenisationspuffer Enzymfraktionen gewonnen, die eine geringere Aktivität im zellfreien System aufwiesen. Deshalb muß angenommen werden, daß durch hohe Salzkonzentrationen hauptsächlich "Störfaktoren" in die Enzymfraktion gelangen. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Überstandsenzyme zeigt, daß das System mit 0.5 mg Protein/ml gesättigt ist (Abb. 8). Neben Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und Faktoren enthielt die Enzymfraktion auch tRNS. Die Konzentration der tRNS war so hoch, daß dem Ansatz keine weitere tRNS mehr zugegeben werden mußte [unveröffentlichte Ergebnisse].

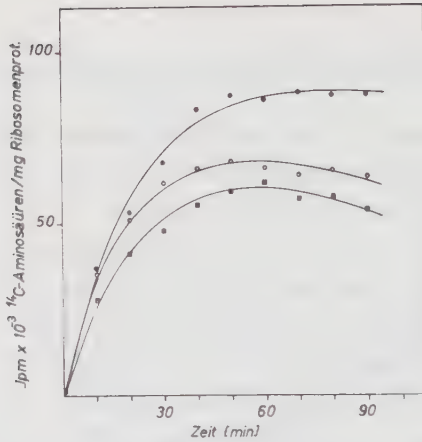


Abb. 7:

Verschiedene Enzymfraktionen wurden auf ihre Aktivität im Polyribosomen-abhängigen System getestet. Die Hefen wurden mit Puffer E, aber verschiedenen KCl-Konzentrationen (50 mM, 200 mM und 500 mM KCl) homogenisiert und, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet.

●—● 50 mM KCl, ○—○ 200 mM KCl, ■—■ 500 mM KCl.

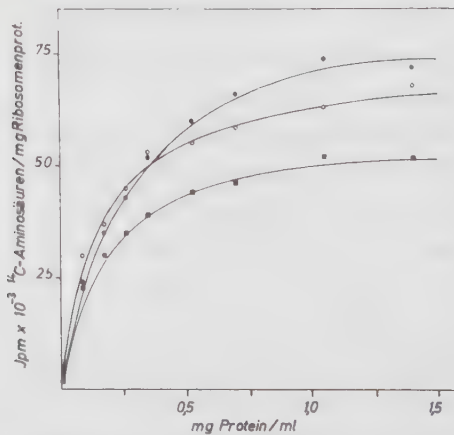


Abb. 8:

Konzentrationsabhängigkeit der Proteinsynthese von den Überstands-enzymen. Die Enzymfraktionen wurden, wie unter Material und Methoden angegeben, isoliert und im Polyribosomen-abhängigen System getestet.

●—● 50 mM KCl, ○—○ 200 mM KCl, ■—■ 500 mM KCl.

4.3 Zellfreies Polyribosomen-abhängiges Protein-synthetisierendes System

4.3.1 Abhängigkeit von der Polyribosomenkonzentration

Die durch endogene mRNS gesteuerte zellfreie Proteinbiosynthese zeigt bis zu 2,5 mg Polyribosomen/ml eine lineare Abhängigkeit von der Polyribosomenkonzentration (Abb. 9). Mit 4 mg Polyribosomen/ml wird eine Sättigung erreicht, aber mehr als 7 mg Polyribosomen/ml hemmen den Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in Protein.

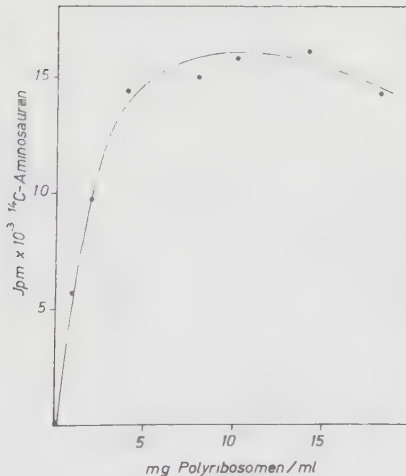


Abb. 9:

Abhängigkeit des Aminosäureeinbaus von der Polyribosomenkonzentration. Die Inkubationsbedingungen sind in Material und Methoden angegeben.

4.3.2 Inkubationstemperatur

Ein maximales Wachstum der Hefekulturen (Stamm 211) ist bei 30°C zu beobachten. Dementsprechend ist auch für den Aminosäureeinbau im zellfreien System ein Temperaturoptimum in diesem Bereich zu erwarten. Der in Abb. 10 dargestellte Versuch bestätigt diese Annahme. Die optimale Temperatur für die *in vitro* Proteinbiosynthese liegt zwischen 25°C und 30°C. Bei 35°C und 40°C ist zwar die Initialgeschwindigkeit höher, die Reaktion bricht aber nach 40 min bzw. 20 min ab, während bei 25°C und 30°C die Synthese nach 90 min noch nicht beendet ist.

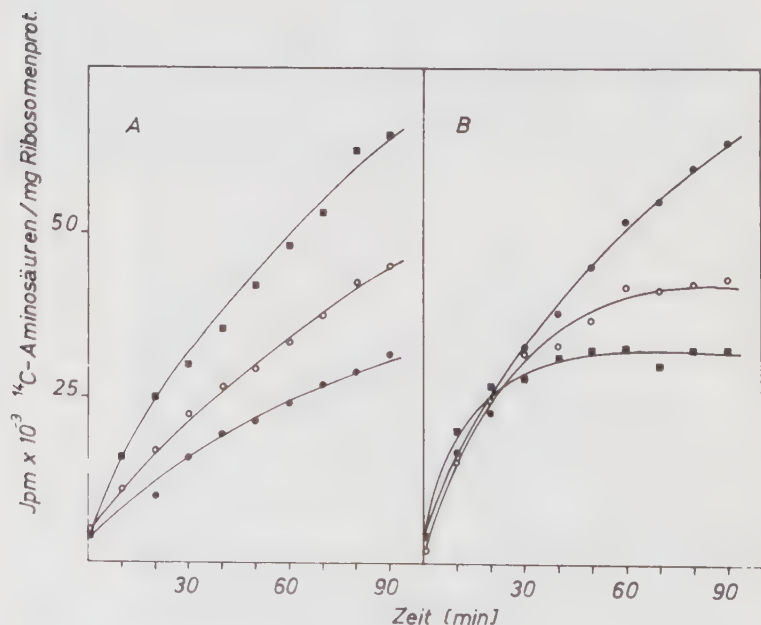


Abb. 10:

Temperaturabhängigkeit des Polyribosomen-Systems.

Die Inkubationsbedingungen wurden in Material und Methoden beschrieben. A, ●—● 15°C, ○—○ 20°C, ■—■ 25°C.

B, ●—● 30°C, ○—○ 35°C, ■—■ 40°C.

3.3 Energie-lieferndes System

Die Proteinbiosynthese benötigt Energie in Form von ATP und GTP. Die Energie für die Initiation und Elongation wird durch GTP bereitgestellt. Dagegen wird ATP für die Aminoacylierung der tRNS und zum Regenerieren von GTP gebraucht. Der Inkubationsansatz enthielt außerdem ein ATP-regenerierendes System, das sich aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und PEP-Kinase zusammensetzte. Die Abhängigkeit der zellfreien Proteinbiosynthese von den Triphosphaten ist sehr unterschiedlich. Mit 0.3 mM GTP wird die höchste Aktivität erzielt (Abb. 11). Ohne GTP erreicht das System jedoch immer noch 75% des maximalen Aminosäureeinbaus. Im Gegensatz

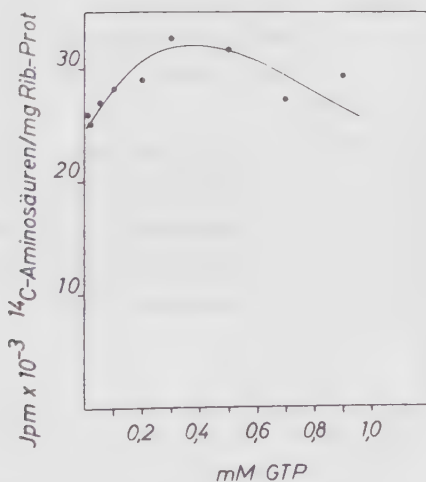


Abb. 11:

Einfluß der GTP-Konzentration auf die Polyribosomen-abhängige Proteinbiosynthese. Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden.

zu der schwachen Abhängigkeit vom GTP zeigt das System ein ausgeprägtes Maximum für die ATP-Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 12). Dieser Kurvenverlauf ist mit und ohne PEP (10 mM) zu beobachten. In beiden Versuchen liegt die optimale ATP-Konzentration bei 1,5 mM ATP. Der dominierende Einfluß des ATP auf die zellfreie Proteinbiosynthese hat mindestens zwei Gründe.

- 1] Die starke Abhängigkeit vom ATP läßt darauf schließen, daß dieses Triphosphat der Hauptenergieträger für das in vitro System ist.
- 2] Ein ATP-Überschuß führt zu einer vollständigen Hemmung des Aminosäureeinbaus. Diese Inhibition wird durch die Eigenschaft des ATP, Magnesiumionen zu binden, verursacht (siehe auch MgCl_2 -Abhängigkeit).

Das nächste Experiment verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der ATP- und der Magnesiumionenkonzentration (Abb. 13). Wird ATP zusammen mit Magnesium im Verhältnis 1 : 1 zu dem Inkubationsansatz gegeben, liegt der maximale Aminosäureeinbau bei einer zehnmal höheren ATP-Konzentration (15 mM), als bei dem oben beschriebenen Versuch.

Neben ATP bindet auch GTP Magnesiumionen. Wegen der niedrigen GTP-Konzentration tritt der Effekt hier jedoch nicht in Erscheinung. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Verhältnis von der Triphosphat-, insbesondere ATP, zu der Magnesiumionenkonzentration von wesentlicher Bedeutung für das zellfreie System ist.

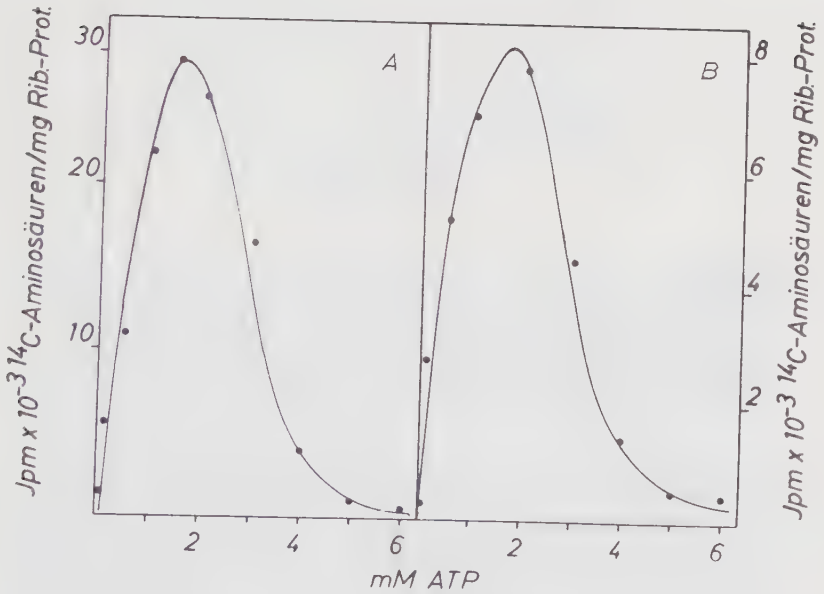


Abb. 12:

ATP-Konzentrationsabhängigkeit.

Die Inkubation erfolgte bei verschiedenen ATP-Konzentrationen ohne (A) oder mit 10 mM PEP (B), aber sonst wie in Material und Methoden beschrieben.

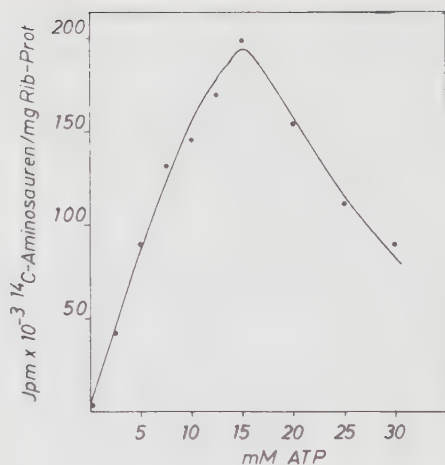


Abb. 13:

ATP/ MgCl_2 -Konzentrationsabhängigkeit.

ATP wurde zusammen mit MgCl_2 (1:1) zum Inkubationsansatz gegeben. In jedem Ansatz waren zusätzlich, wie in Material und Methoden angegeben, 6 mM MgCl_2 enthalten.

In dem zellfreien System dient Phosphoenolpyruvat (PEP) als "Energiereservoir". Aus Abb. 14 ist zu ersehen, daß 3 mM PEP die optimale Konzentration für die *in vitro* Proteinbiosynthese ist. Die Einbaurate wird um 50% erhöht. Aber ein Überschuß an PEP ergibt eine vollständige Hemmung des Aminosäureeinbaus. In diesem Fall kann jedoch keine durch Erniedrigung der Magnesiumionenkonzentration hervorgerufene Inhibition angenommen werden, da auch mit 10 mM PEP der Kurvenverlauf der ATP-Konzentrationsabhängigkeit nicht verändert wurde (siehe Abb. 12). Auch eine Inhibition der PEP-Kinase muß ausgeschlossen werden, weil ohne dieses Enzym immer noch 50% des maximalen Aminosäureeinbaus erreicht werden konnte [unveröffentlichte Ergebnisse].

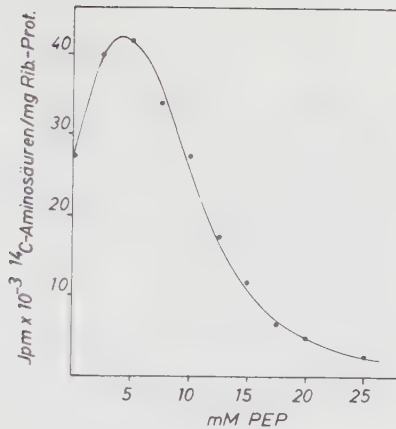


Abb. 14:

Abhängigkeit des Aminosäureeinbaus von der PEP-Konzentration.
Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden.

4.3.4

MgCl₂ - und KCl-Konzentrationen

In dem durch endogene mRNS gesteuerten zellfreien Protein-synthesierenden System laufen zwei Reaktionen, Translation und Aminoacylierung, nebeneinander ab, die beide Magnesiumionen benötigen. Für das Gesamtsystem wurde eine optimale Konzentration von 6mM MgCl₂ ermittelt (Abb. 15). In dem gleichen Bereich liegen die Angaben von Mager und Planta [57] (5 mM MgCl₂) sowie Gallis und Young [59] (6 mM MgCl₂). Im Fall der monovalenten Ionen wurden von beiden Arbeitsgruppen jedoch unterschiedliche Optima gefunden. Während Mager und Planta [57] mit 10 mM NH₄Cl arbeiteten, erzielten Gallis und Young [59] mit 85 mM KCl den höchsten Aminosäureeinbau. In dem von mir beschriebenen System liegt die optimale Konzentration zwischen 40 mM und 60 mM KCl (Abb. 16).

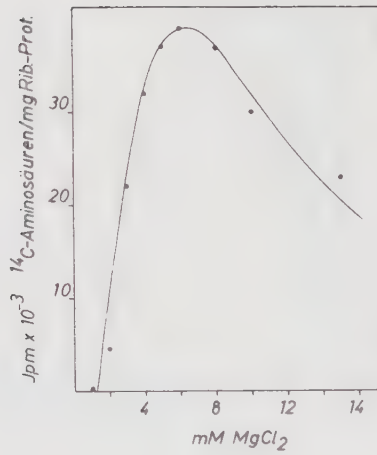


Abb. 15:

Einfluß der MgCl₂-Konzentration auf das Polyribosomensystem.
Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden.

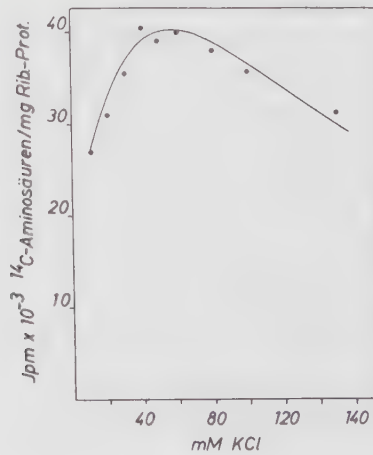


Abb. 16:

Einfluß der KCl-Konzentration auf das Polyribosomensystem.
Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden.

4.4

Wirkung von Antibiotika auf die Polyribosomen-abhängige Proteinbiosynthese

4.4.1

Hemmung der Initiation

Um zu testen, ob der durch endogene mRNA gesteuerte Aminosäureeinbau auf Initiation und Elongation oder nur auf Elongation der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, wurden dem zellfreien System spezifisch wirkende Antibiotika zugefügt. Die Initiation der Proteinbiosynthese kann auf mehreren Stufen durch Antibiotika blockiert werden [60]. Während geringe Konzentrationen von Aurintricarboxylic Acid (ATA) die Anlagerung der mRNA an die 40S-Untereinheit verhindert, wird durch Edeine die Bindung der Met-tRNA an das Initiationscodon beeinflusst. Natriumfluorid (NaF) behindert die Bindung der 60S-Untereinheit an den Initiationskomplex.

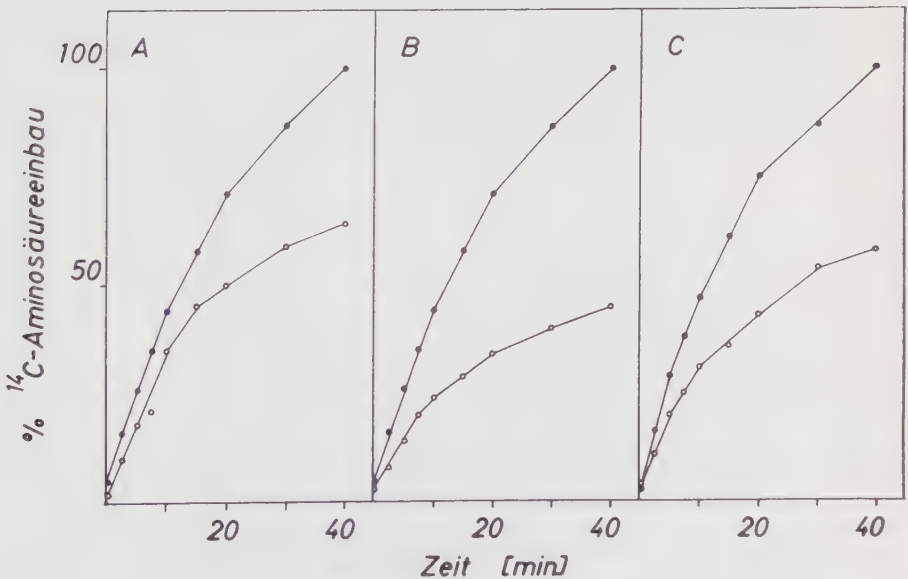


Abb. 17:

Hemmung der Initiation der Proteinbiosynthese im zellfreien System (Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden) mit 75 μM ATA

(A), 5 mM Edeine (B) und 5 mM NaF (C).

● — ● ohne Antibiotika, ○ — ○ mit Antibiotika.

Wie aus Abb. 17 zu ersehen ist, wird der Aminosäureeinbau durch Aurintricarboxylic Acid, Edeine und Natriumfluorid gehemmt. Damit wurde bewiesen, daß in diesem von hoch gereinigten Polyribosomen abhängigen System eine Reinitiation der Proteinbiosynthese stattfindet.

4.4.2 Inhibition der Elongation von 80S-Ribosomen

Die Elongation der Ribosomen vom 80S-Typ wird durch Cycloheximid, die vom 70S-Typ durch Chloramphenicol gehemmt [60]. Abb. 18 zeigt, daß Cycloheximid den Aminosäureeinbau zu 70% inhibierte. Dagegen bewirkte Chloramphenicol nur eine Hemmung von 6 %. Dies berechtigt zu der Annahme, daß keine oder nur sehr wenige mitochondriale 70S-Ribosomen im Inkubationsansatz enthalten waren.

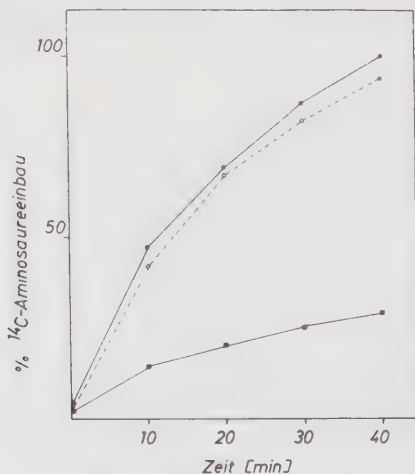


Abb. 18:

Hemmung der zellfreien Proteinbiosynthese mit Cycloheximid und Chloramphenicol. Die Inkubation wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

●—● ohne Antibiotika, ■—■ 1 mM Cycloheximid,
○—○ 1 mM Chloramphenicol.

Vergleich der optimalen Ionenkonzentrationen von Transkription und Translation

MnCl₂- und MgCl₂-Konzentrationen

Mit dem Polyribosomen-abhängigen System wurde der Einfluß verschiedener Ionenbedingungen auf die Translation untersucht, um Möglichkeiten für eine zellfreie DNS-abhängige Proteinbiosynthese zu finden. Mehrere Autoren [61-63] haben eine ausgeprägte Abhängigkeit der Transkription von der Manganionenkonzentration beschrieben. Deshalb war es notwendig, die Wirkung von MnCl₂ auf die Translation zu prüfen.

Die Abhängigkeit der Proteinbiosynthese von der Manganionenkonzentration wurde bei 2 mM, 3 mM und 6 mM MgCl₂ getestet (Abb. 19). Wurde mit der für die Translation optimalen Konzentration von 6 mM MgCl₂ inkubiert, nahm die Aminosäureeinbaurrate mit steigender MnCl₂-Konzentration stark ab. Dagegen wurden mit 2 mM und 3 mM MgCl₂ Maxima bei 2 mM bzw. 1.5 mM MnCl₂ erreicht. Diese Werte

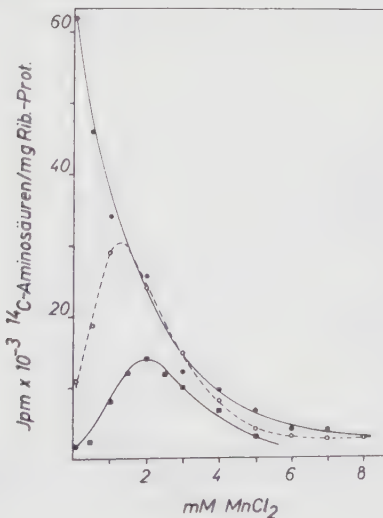


Abb. 19:

Einfluß von Magnesium- und Manganionen auf die zellfreie Proteinbiosynthese. Abhängigkeit des Aminosäureeinbaus von der MnCl₂-Konzentration bei ●—● 6 mM MgCl₂, ○—○ 3 mM MgCl₂ und ■—■ 2 mM MgCl₂.

lagen aber 50% bzw. 75% unter der Syntheserate des Mangan-freien Ansatzes. Diese Ergebnisse zeigen, daß Manganionen in begrenztem Umfang Magnesiumionen ersetzen können.

4.5.2 KCl- und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen

Neben divalenten Ionen werden Kalium- oder Ammoniumionen für die zellfreie mRNS- und Proteinsynthese benötigt. Die Polyribosomen waren über einen weiten Bereich der KCl-Konzentration, mit einem Maximum bei 50 mM KCl, aktiv (Kap. 4.3.4). Ponta et al. fanden eine Steigerung der Transkriptionsrate durch Ammoniumsulfat, wenn heterologe DNS im Hefesystem als Matrize benutzt wurde [61], aber eine Inhibition bei Einsatz gereinigter Hefe-DNS [13]. Neuere Untersuchungen von Hagemann et al. [64] haben ergeben, daß die DNS-abhängige RNS-Polymerase B auch bei Inkubationen mit KCl aktiv ist. Der Einfluß der Ammoniumsulfatkonzentration auf die Translation wurde bei 50 mM, 30 mM und ohne KCl untersucht. Bei allen drei KCl-Konzentrationen ist eine Hemmung des Aminosäureeinbaus schon mit niedrigen Ammoniumsulfatkonzentrationen zu verzeichnen.

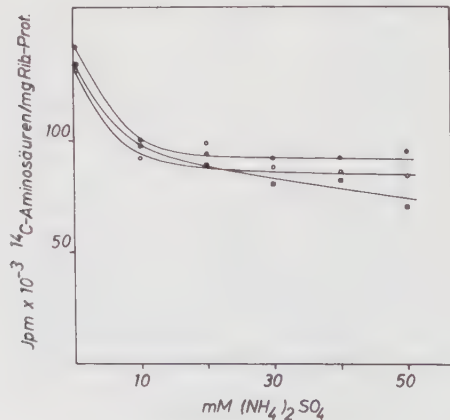


Abb. 20:

Einfluß von Ammoniumsulfat auf den Aminosäureeinbau bei verschiedenen KCl-Konzentrationen. Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden. ●—● ohne KCl, ○—○ 30 mM KCl, ■—■ 50 mM KCl.

4.6

Polyribosomenisolierung nach Induzierung der sauren Phosphatase von *Schizosaccharomyces pombe*

Für die Isolierung und Translation spezifischer mRNS sollten Polyribosomen nach der Induzierung eines Enzyms aus Hefen gewonnen werden. Als induzierbares Enzym wurde die saure Phosphatase aus *Schizosaccharomyces pombe* gewählt. Die Induzierung erfolgte durch Phosphatentzug [65], indem in Phosphat-reichem Medium gezüchtete Hefen in EM-Medium gegeben wurden (Kap. 3.2.1). Nach ca. 2 h konnte ein Anstieg der Phosphataseaktivität beobachtet werden (Abb. 21). Die Hefen wurden geerntet und die Polyribosomen, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert. Die Sedimentationsanalyse ergab einen verhältnismäßig hohen Anteil von Monoribosomen (Abb. 22). Dennoch waren die Polyribosomen im zellfreien System sehr aktiv (Abb. 23) und auch eine Reinitiation der Translation konnte nachgewiesen werden (Abb. 24). Der Versuch im zellfreien System synthetisierte saure Phosphatase nachzuweisen ist jedoch nicht gelungen. Weder Membranfreie noch an Membranen gebundene Polyribosomen waren für die *in vitro* Synthese von aktiver Phosphatase geeignet.

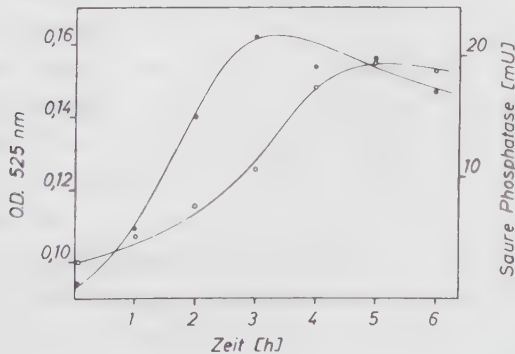


Abb. 21:

Induzierung von saurer Phosphatase durch Phosphatentzug.

○ — ○ Enzymaktivität ● — ● Wachstumskurve *S. pombe* Stamm 975.

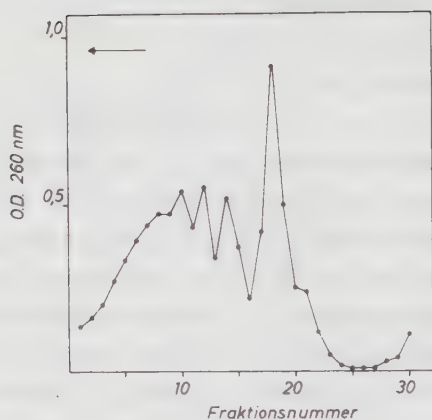


Abb. 22:

Sedimentationsanalyse von Polyribosomen aus *S. pombe* (Stamm 975). Die Sedimentation wurde 5 h mit $131\,000 \times g$ im SW 27 Rotor durchgeführt (20-45% Saccharosegradient).

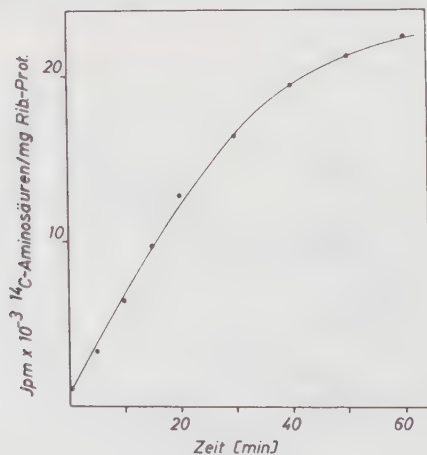


Abb. 23:

Zellfreie Proteinbiosynthese mit Polyribosomen aus *S. pombe* (Stamm 975). Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden.

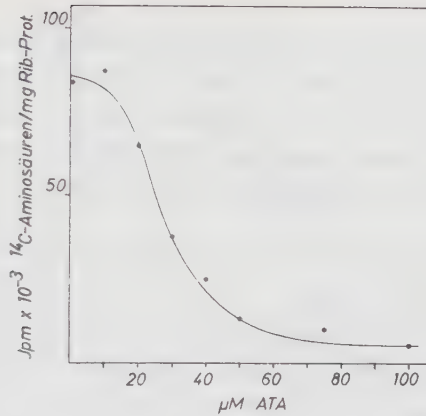


Abb. 24:

Hemmung des Aminosäureeinbaus durch Aurintricarboxylic Acid. Polyribosomen aus *S. pombe* wurden im zellfreien System inkubiert (siehe Material und Methoden).

4.7 Ribosomale Ribonuklease

4.7.1 Autodegradation von Polyribosomen

Für die zellfreie Polyribosomen-abhängige Proteinsynthese werden ATP und Magnesiumionen benötigt. In Kap. 4.3.3 konnte gezeigt werden, daß das Verhältnis von ATP/MgCl₂ von entscheidender Bedeutung für die Aktivität des Systems ist. Ein Mangel an freien Magnesiumionen führte zu einer Hemmung des Aminosäureeinbaus. In den folgenden Versuchen wurde deshalb der Einfluß des ATP/MgCl₂-Konzentrationsverhältnisses im Inkubationsansatz auf die Polyribosomen untersucht.

Mit 2-¹⁴C-Uracil markierte Polyribosomen wurden mit 6 mM MgCl₂ und steigenden ATP-Konzentrationen bei 35°C in Puffer B inkubiert und anschließend sedimentiert. Aus den Sedimentationsanalysen ist eine deutliche Abnahme der Polyribosomen zugunsten von Monoribo-

somen zu erkennen, wenn mit 5 mM ATP inkubiert wurde (Abb. 25). Bei höheren ATP-Konzentrationen tritt im Bereich von 40S ein Peak auf, und gleichzeitig ist eine Zunahme von leichtem Material zu beobachten. Bei einer Inkubation mit 9 mM ATP wurden Polyribosomen und Monoribosomen vollständig degradiert.

Um weitere Aussagen über die Wirkung von ATP (8 mM) auf Polyribosomen machen zu können, wurde die Abhängigkeit der Polyribosomendegradation von Zeit und Temperatur getestet. Aus Abb. 26 ist zu ersehen, daß bereits nach 10 min alle Polyribosomen zu Monoribosomen abgebaut wurden und ein Doppelpeak im Bereich von 40S bis 50S entstand. Nach 20 min Inkubationszeit ist neben dem Monoribosomenpeak nur noch ein Peak bei ca. 40S zu beobachten, und nach 30 min kann durch Autodegradation entstandenes leichtes Material nachgewiesen werden, das im weiteren Verlauf der Inkubation noch zunimmt. Das nach 40 min Inkubationszeit im Polyribosomenbereich sedimentierende Material bestand wahrscheinlich aus unspezifischen Ribonukleinsäure-Protein-Koagulaten.

Die Temperaturabhängigkeit des Polyribosomenabbaus zeigt Abb. 27. Bei 20°C bis 30°C mit 8 mM ATP inkubierte Polyribosomen zerfielen z.T. zu Material, das bei 40S bandet und erst bei Inkubationstemperaturen von 35°C und 40°C entstand leichtes Material.

Um zu prüfen, ob die ATP-abhängige Polyribosomendegradation nur auf Magnesiummangel zurückzuführen ist, oder andere Effekte die Ursache sind, wurden Polyribosomen mit 6 mM $MgCl_2$ und verschiedenen EDTA-Konzentrationen inkubiert. Wie aus Abb. 28 zu ersehen ist, erfolgt auch unter diesen Bedingungen ein Abbau der mit 2-¹⁴C-Uracil markierten Ribonukleinsäuren. Damit ist nachgewiesen, daß die Autodegradation der Polyribosomen durch Magnesiumentzug hervorgerufen wird.

Mit den Sedimentationsanalysen konnte der Abbau von Polyribosomen zu leichtem Material gezeigt werden. Es war jedoch nicht möglich

zwischen Abbauprodukten mit höherem Molekulargewicht und Nukleotiden zu unterscheiden, da der verwendete Saccharosegradient für eine Auftrennung von RNS-Molekülen in der Größenordnung der tRNS und Nukleotiden nicht geeignet ist. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Ribonuklease-Test durchgeführt, bei dem mit der Messung des säurelöslichen Materials die Enzymaktivität bestimmt wird.

Wurden Polyribosomen mit ATP inkubiert und nach verschiedenen Zeiten mit Säure gefällt, war eine Zunahme der Konzentration von 2-¹⁴C-Uracil im Überstand zu beobachten (Abb. 29). Aus diesen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß Hefe-Polyribosomen eine Ribonuklease enthalten, die bei Magnesiummangel die Ribosomen degradiert.

4.7.2 Untersuchungen über die Ribonuklease-Aktivität von ribosomalen Untereinheiten

In Kap. 4.7.1 wurde der Nachweis erbracht, daß an Hefe-Polyribosomen eine Ribonuklease assoziiert ist. Es konnte aber noch nicht geklärt werden, ob dieses Enzym natürlicher Bestandteil der Ribosomen oder nur artifiziell gebunden ist. Im ersten Fall wäre es wahrscheinlich, daß das Enzym entweder in der 60S- oder in der 40S-Untereinheit enthalten ist. Sollte es gelingen Ribonuklease-Aktivität nur an einer der ribosomalen Untereinheiten nachzuweisen, wäre dies der Beweis für eine ribosomale Ribonuklease in Hefen.

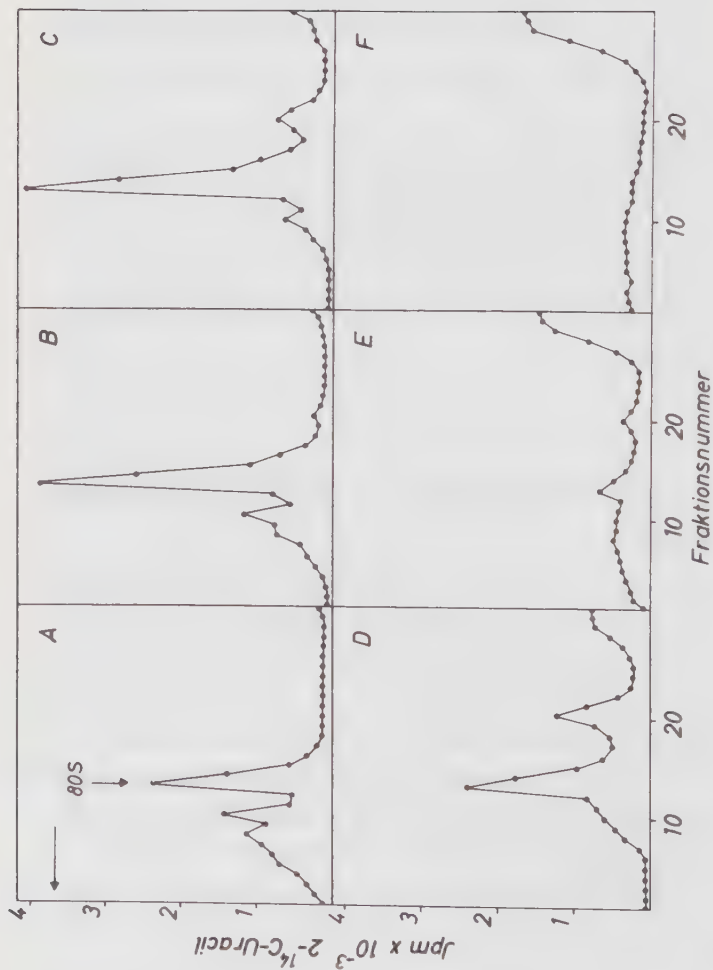


Abb. 25:

Sedimentationsanalyse von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Uracil markierten Polyribosomen nach Inkubation mit verschiedenen ATP-Konzentrationen (16 h mit $46\,000 \times \text{g}$ im SW 27 Rotor, 5-50% Saccharosegradient). A) ohne ATP, B) 5 mM ATP, C) 6 mM ATP, D) 7 mM ATP, E) 8 mM ATP, F) 9 mM ATP. Inkubationszeit 50 min, Inkubationstemperatur 35°C

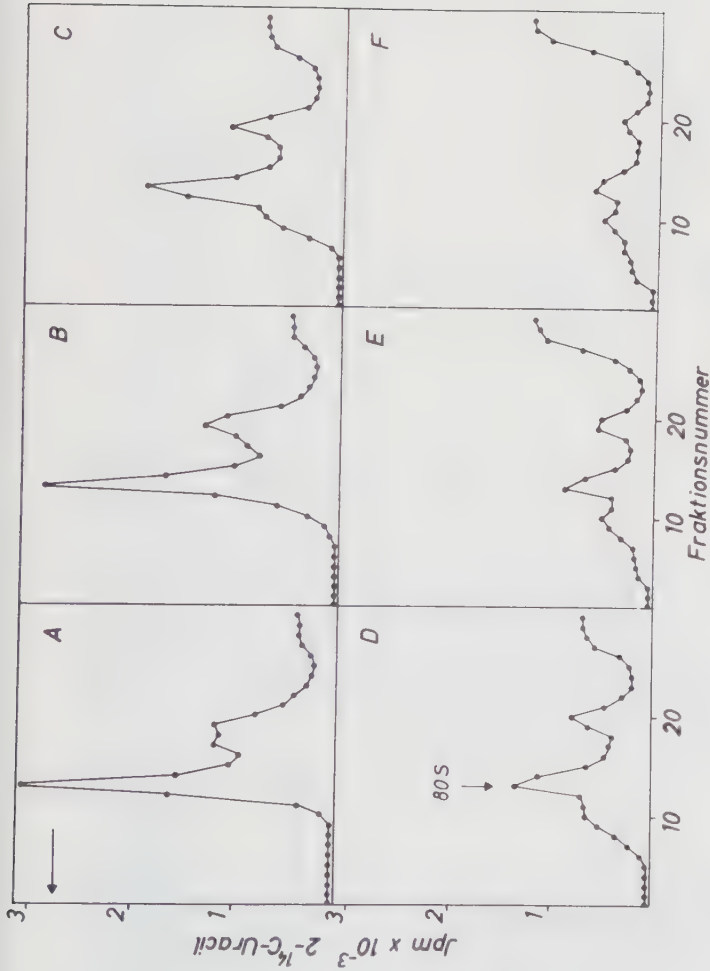


Abb. 26:
Mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Uracil markierte Polyribosomen wurden mit 6 mM MgCl_2 , 8 mM ATP in Puffer B bei 35°C verschiedene Zeiten inkubiert und anschließend 16 h mit $46\,000 \times g$ im SW 27 Rotor sedimentiert (5–50% Saccharosegradient).
A) 10 min, B) 20 min, C) 30 min, D) 40 min, E) 50 min, F) 60 min.

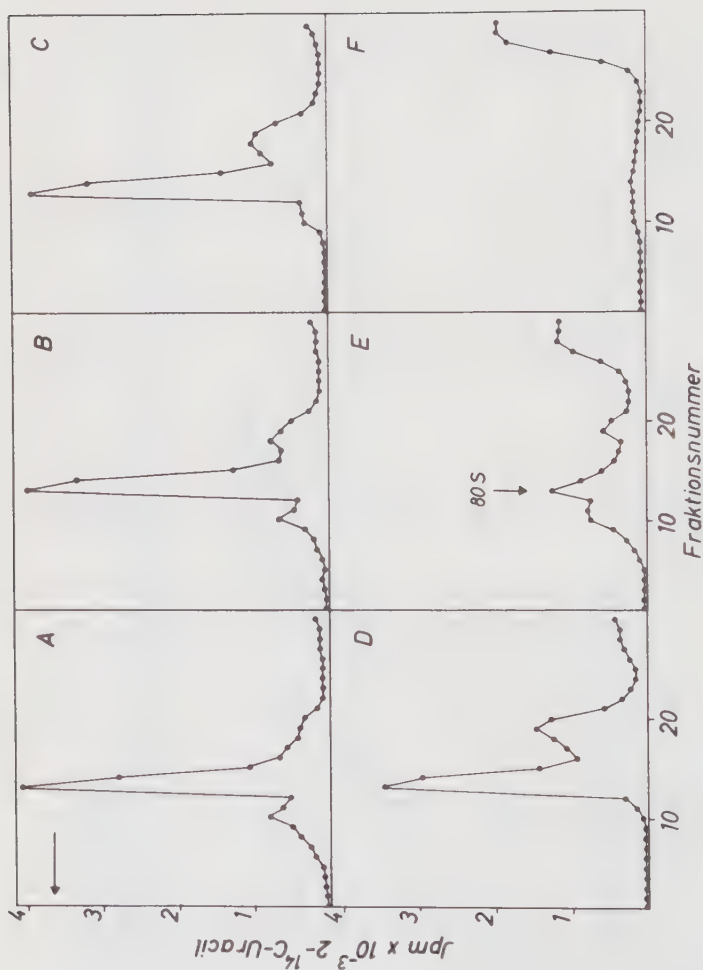


Abb. 27:
Temperaturabhängigkeit der Polyribosomendegradation. Mit $2\text{-}^{14}\text{C-Uracil}$ markierte Polyribosomen wurden mit 6 mM MgCl_2 , 8 mM ATP in Puffer B 40 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend 16 h mit $46\,000 \times \text{g}$ im SW 27 Rotor sedimentiert (5-50% Saccharosegradient).
A) 15°C , B) 20°C , C) 25°C , D) 30°C , E) 35°C , F) 40°C .

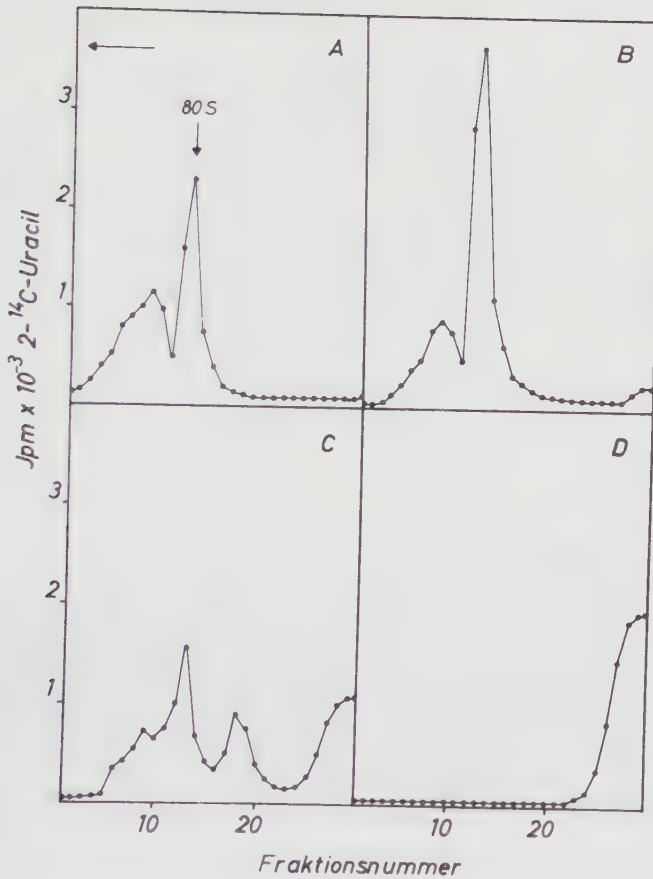


Abb. 28:

Sedimentationsanalyse von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Uracil markierten Polyribosomen nach Inkubation mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen (16 h mit $46\,000 \times g$ im SW 27 Rotor, 5-50% Saccharosegradient). A) ohne EDTA, B) 6 mM EDTA, C) 7 mM EDTA, D) 8 mM EDTA. Inkubationszeit 50 min, Inkubationstemperatur 35°C .

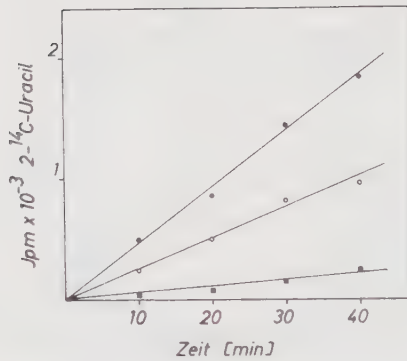


Abb. 29:

Ribonuklease-Test.

Polyribosomen wurden mit 6 mM MgCl_2 in Puffer B bei 35°C mit verschiedenen ATP-Konzentrationen inkubiert. Die Ribonukleinsäuren wurden mit Säure gefällt, abzentrifugiert, und im Überstand wurde die Zunahme von $2\text{-}^{14}\text{C-Uracil}$ gemessen. Oder die nicht degradierten Ribonukleinsäuren wurden an Glasfaserfilter adsorbiert, und aus der Differenz zum 0-min-Wert wurde die Menge des säurelöslichen Materials bestimmt.

■—■ 5 mM ATP, ○—○ 7.5 mM ATP, ●—● 10 mM ATP.

4.7.2.1 Isolierung ribosomaler 60S- und 40S-Untereinheiten

Ribosomen werden durch KCl-Überschuß in 60S- und 40S-Untereinheiten gespalten. Abb. 30 zeigt die Dissoziation von Polyribosomen in ribosomale Untereinheiten in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration. Die Polyribosomen sind bei 200 mM KCl stabil, und auch mit höheren KCl-Konzentrationen dissoziiert nur ein Teil des Materials. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Martin und Hartwell [66], die zeigen konnten, daß mRNS enthaltende Ribosomen im Gegensatz zu "Run off"-Ribosomen gegen hohe KCl-Konzentrationen resistenter sind.

Es ist bekannt, daß die Magnesiumionenkonzentration die Konformation der Ribosomen beeinflußt. Deshalb wurde das Dissoziationsverhalten von Ribosomen bei 500 mM KCl und verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen untersucht (Abb. 31). Mindestens 3 mM MgCl_2 wurden gebraucht, um ein Zerfallen der ribosomalen Untereinheiten zu verhindern. Mit steigender MgCl_2 -Konzentration blieben aber auch zunehmend Polyribosomen erhalten.

Da mRNS-freie Ribosomen für die Herstellung von Untereinheiten besser geeignet sind als Polyribosomen, müssen Polyribosomen in vitro, durch eine Vorinkubation im Protein-synthetisierenden System [67], oder in vivo, durch NaN_3 -Behandlung [68], in "Run off"-Ribosomen umgewandelt werden. Eine Inkubation mit 0.5 mM Puro-mycin war nicht zufriedenstellend, weil die isolierten Untereinheiten im PolyU-Test nicht aktiv waren.

60S- und 40S-Untereinheiten wurden mit isokinetischen oder linearen Saccharosegradienten voneinander getrennt. Abb. 32 zeigt einen Vergleich von verschiedenen Präparationen. Während in vitro inkubierte Polyribosomen mit 3 mM MgCl_2 /600 mM KCl nicht vollständig dissoziieren, sind " NaN_3 "-Ribosomen schon mit 5 mM MgCl_2 /500 mM KCl gespalten.

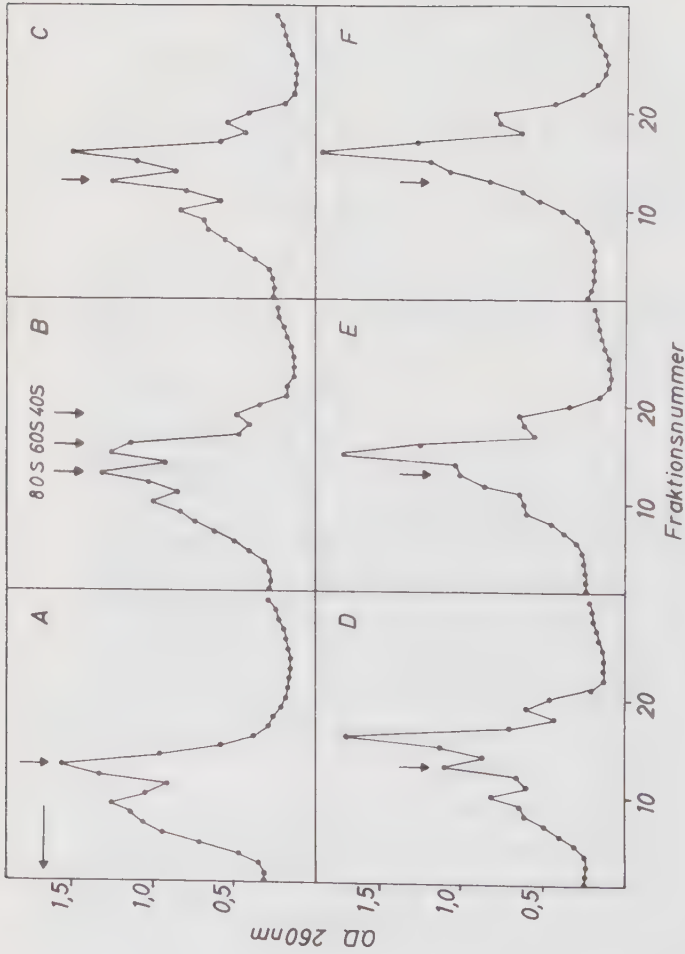


Abb. 30:
Dissoziation von Polyribosomen in ribosomale Untereinheiten in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration (mit 5 mM $MgCl_2$). Die Sedimentationsanalyse erfolgte in 5-50% Saccharosegradienten, die 16 h mit 46 000 x g im SW 27 Rotor zentrifugiert wurden (15°C).
A) 200 mM KCl, B) 400 mM KCl, C) 500 mM KCl, D) 600 mM KCl, E) 800 mM KCl, F) 1 000 mM KCl.

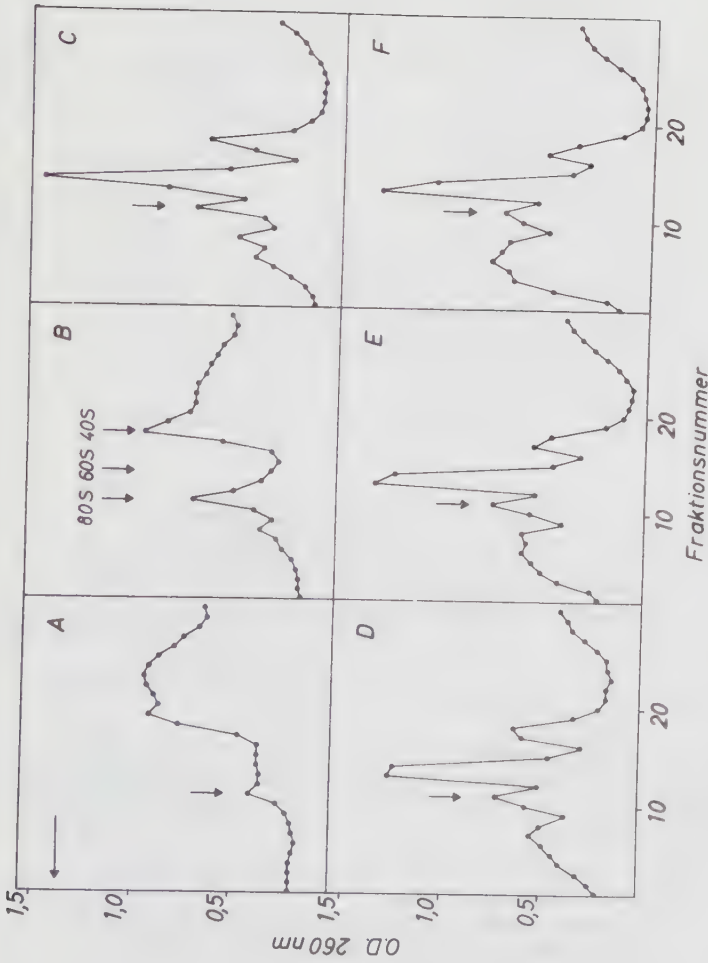


Abb. 31:

Einfluß der $MgCl_2$ -Konzentration auf die Dissoziation von Polyribosomen bei 500 mM KCl. Die Sedimentationsanalyse erfolgte in 5-50% Saccharosegradienten, die 16 h mit 46 000 x g im SW 27 Rotor zentrifugiert wurden (15°C).

A) 1 mM $MgCl_2$, B) 2 mM $MgCl_2$, C) 3 mM $MgCl_2$, D) 4 mM $MgCl_2$, E) 5 mM $MgCl_2$, F) 6 mM $MgCl_2$.

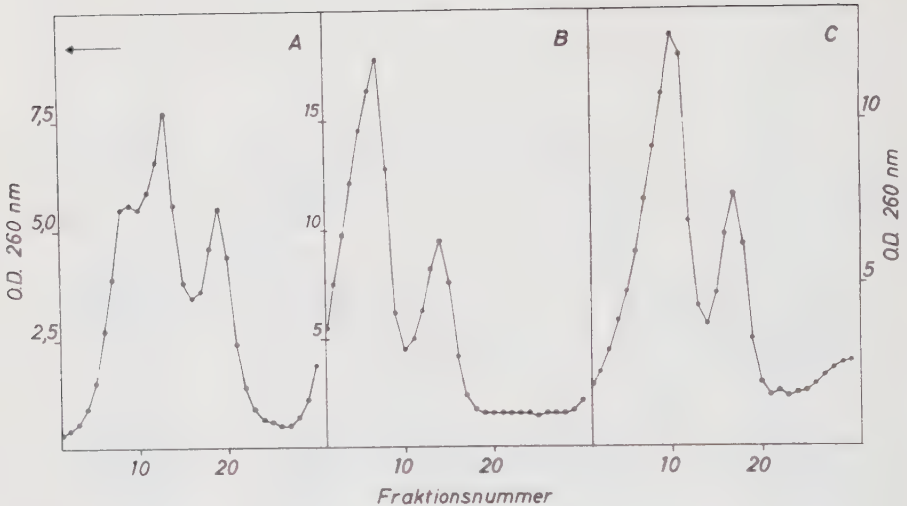


Abb. 32:

Präparation von ribosomalen 60S- und 40S-Untereinheiten.

- A] Polyribosomen wurden im zellfreien System für 40 min bei 30°C inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion (Eisbad) durch Zugabe von KCl (Endkonzentration 550 mM) wurden 150 OD 260 nm Einheiten auf einen 10-30% Saccharosegradienten (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 600 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 0.15 mM EDTA) geschichtet und 6 h mit 131 000 x g bei 15°C zentrifugiert.
- B] 200-300 OD 260 nm Einheiten "NaN₃"-Ribosomen wurden auf einen 15-30% Saccharosegradienten (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 0.25 mM EDTA) gegeben und 8 h mit 131 000 x g bei 15°C zentrifugiert.
- C] "NaN₃"-Ribosomen wurden mit 550 mM KCl in Puffer B 10 min bei 30°C inkubiert und anschließend (225 OD 260 nm Einheiten) auf einen isokinetischen Gradienten (siehe Material und Methoden, 500 mM KCl in Puffer B) geschichtet. Die Sedimentation wurde mit 131 000 x g (6 h) bei 15°C im SW 27 Rotor durchgeführt.

4.7.2.2 Aktivitätstest im PolyU-System

Die biologische Aktivität der 60S- und 40S-Untereinheiten wurde im PolyU-abhängigen System getestet. Abb. 33 zeigt eine MgCl_2 -Konzentrationsabhängigkeit der Polyphenylalaninsynthese. Mit 10 mM bis 12 mM MgCl_2 erreichten die Untereinheiten ihre maximale Aktivität und lagen damit deutlich über der optimalen MgCl_2 -Konzentration des Polyribosomen-abhängigen Systems (Kap. 4.3.4).

Zur Charakterisierung der Untereinheiten wurde auch eine Komponentenabhängigkeit durchgeführt. Wie aus Abb. 34 zu ersehen ist, war das System ohne Enzymfraktion, PolyU oder Energie nicht aktiv. Dagegen erreichten die 40S-Untereinheiten 68% und die 60S-Untereinheiten 41% vom Phenylalanineinbau des Gesamtsystems. Es ist aber anzunehmen, daß die mit den 40S-Untereinheiten gemessene Radioaktivität auf säurefällbare 40S-PolyU- ^{14}C -Phe-tRNS-Komplexe zurückzuführen ist. Die Aktivität der 60S-Untereinheitenfraktion beruht jedoch wahrscheinlich auf Verunreinigung mit 80S-Ribosomen oder 40S-Dimeren. Zur Klärung dieser Fragen wurden von Becker [69] die Untersuchungen über die Isolierung von aktiven ribosomalen Untereinheiten weitergeführt.

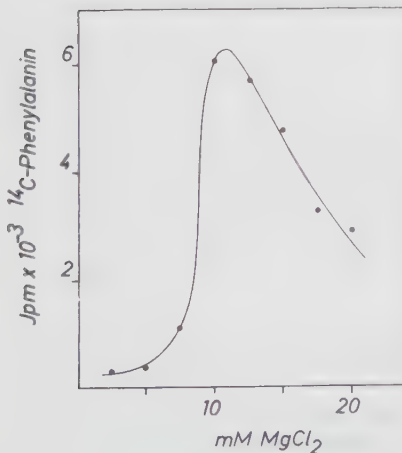


Abb. 33:

MgCl_2 -Konzentrationsabhängigkeit des PolyU-Systems. Die Inkubation wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

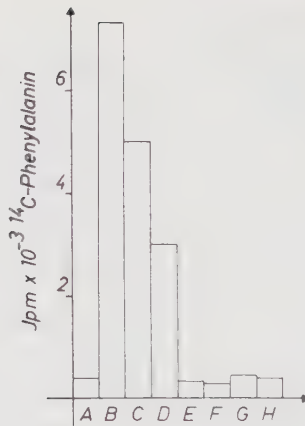


Abb. 34:

Komponentenabhängigkeit des PolyU-Systems.

Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden.

A) 0 min Kontrolle des Gesamtsystems, B) Gesamtsystem 60 min, C) ohne 60S-Untereinheiten, D) ohne 40S-Untereinheiten, E) ohne Ribosomen, F) ohne Enzymfraktion, G) ohne PolyU, H) ohne Energie.

4.7.2.3 Autodegradation ribosomaler Untereinheiten

Die Autodegradation von 60S- und 40S-Untereinheiten wurde mit Sedimentationsanalysen und Ribonukleasetests untersucht. Mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen durchgeführte Inkubationen zeigten bei der kleinen und großen Untereinheit eine unterschiedliche Wirkung. Während die 60S-Untereinheit in einer homogenen Bande sedimentierte, wenn mit 4 mM oder ohne EDTA inkubiert wurde, erschien das Material der 40S-Untereinheit in zwei Banden (Abb. 35 A, B). Bei einer Inkubation mit 6 mM EDTA waren die Untereinheiten nicht mehr stabil. Die 60S-Untereinheit zerfiel, ohne jedoch leichtes Material zu bilden. Dagegen erfolgte bei der 40S-Untereinheit eine vollständige Degradation.

Der Ribonukleasetest bestätigt diese Ergebnisse. Während die 40S-Untereinheit zu säurelöslichem Material abgebaut wurde, war bei der 60S-Untereinheit nur eine geringe Zunahme der Extinktion (260 nm) im Überstand nach der Säurefällung zu beobachten (Abb. 36).

Diese Experimente haben den Nachweis erbracht, daß die Autodegradation der Polyribosomen durch eine Ribonuklease hervorgerufen wird, die in der 40S-Untereinheit lokalisiert ist. Damit konnte gezeigt werden, daß auch Hefe-Ribosomen eine an die kleine Untereinheit gebundene Ribonuklease besitzen, wie es von *E. coli* [70-73] und Rattenleber-Ribosomen [74] schon bekannt war.

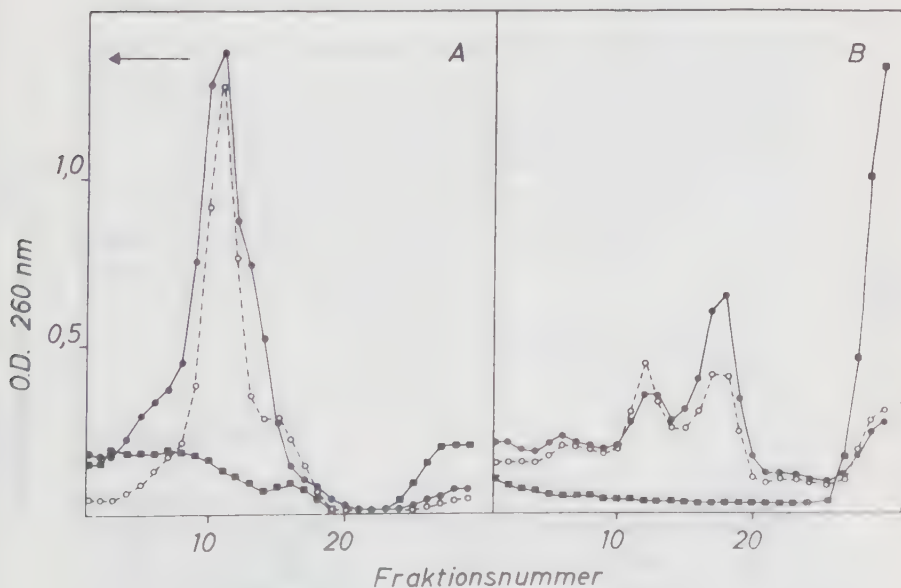


Abb. 35: Sedimentationsanalyse ribosomaler Untereinheiten nach Inkubation mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen.

A] 60S-Untereinheiten wurden 50 min bei 35°C mit

○ — ○ 4 mM EDTA, ■ — ■ 6 mM EDTA und
● — ● ohne EDTA inkubiert.

B] 40S-Untereinheiten wurden 50 min bei 35°C mit ○ — ○ 4 mM EDTA,

■ — ■ 6 mM EDTA und ● — ● ohne EDTA inkubiert.

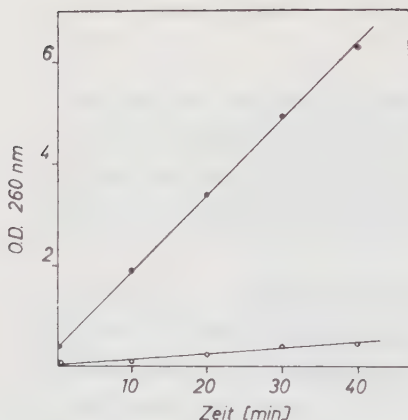


Abb. 36:

Ribonukleasetest mit 60S- und 40S-Untereinheiten. Die ribosomalen Untereinheiten wurden mit 10 mM EDTA bei 35°C inkubiert. Die Zunahme der Extinktion (260 nm) in dem Überstand nach der Säurefällung ist ein Maß für die Ribonukleaseaktivität.

○—○ 60S-Untereinheiten
●—● 40S-Untereinheiten

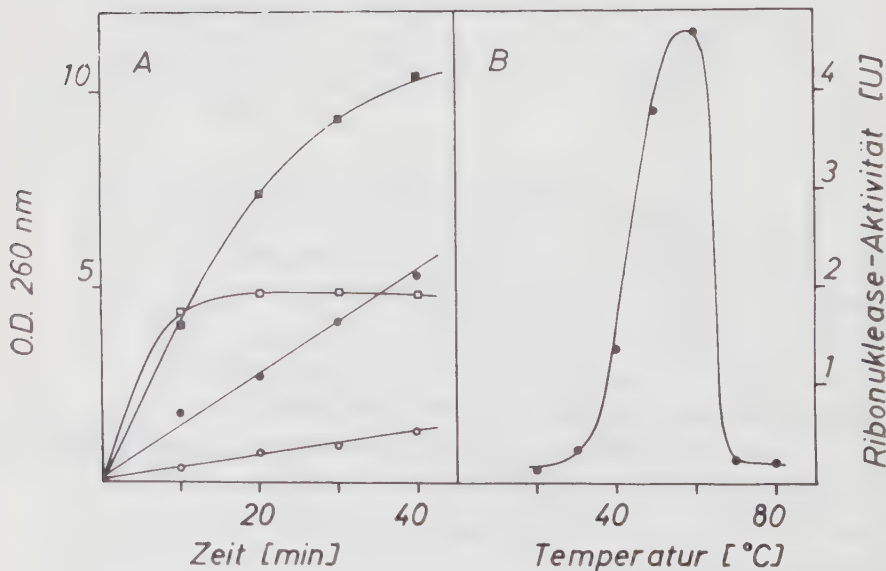


Abb. 37:

Einfluß der Temperatur auf die Autodegradation von Polyribosomen. Polyribosomen wurden mit 10 mM EDTA in Puffer B bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. A) Reaktionsverlauf bei verschiedenen Temperaturen: ○—○ 30°C, ●—● 40°C, ■—■ 50°C, □—□ 60°C. B) Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion von der Temperatur. ($U \approx 0.1 \text{ OD}_{260\text{nm}}/\text{ml} \cdot \text{min}$).

4.7.3

Temperaturabhängigkeit

Der Einfluß der Temperatur auf die Ribonuklease-Aktivität wird in Abb. 37 dargestellt. Wird die Autodegradation von Polyribosomen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, ist eine Zunahme der Aktivität mit steigender Temperatur zu beobachten, aber gleichzeitig wird auch die Inaktivierung des Enzyms beschleunigt. Bei 60°C hat die Reaktion die höchste Anfangsgeschwindigkeit, die Ribonuklease ist jedoch nach 10 min inaktiviert. Höhere Temperaturen denaturieren das Enzym sofort. Ebenfalls ein hohes Temperaturoptimum (55°C) wurde von Ingebretsen et al. [75] für eine Ribonuklease aus Rattenleber-Polyribosomen gefunden.

Wurde mit 50°C inkubiert, konnte schon nach wenigen Minuten im Inkubationsansatz eine durch denaturierte Proteine hervorgerufene Trübung festgestellt werden, während die Ribonuklease-Aktivität erst nach 20 min abnahm. Diese Eigenschaft wird für die Isolierung des Enzyms genutzt. Durch Inkubation mit 10 mM EDTA bei 50°C und anschließender Zentrifugation wird die Ribonuklease in einem Arbeitsgang aus den Ribosomen herausgelöst und von einem Teil der Proteine getrennt [76].

4.7.4

Abbau von PolyU

Die Autodegradation der Polyribosomen wurde durch Inkubation mit 10 mM EDTA ermöglicht. Unter diesen unphysiologischen Bedingungen war die Ribonuklease in der Lage, ribosomale RNS zu degradieren. Zur Charakterisierung des Enzyms wurde auch die Wirkung auf PolyU geprüft (Abb. 38). Es hat sich jedoch gezeigt, daß PolyU unter den gegebenen Bedingungen gegen den Angriff dieser Ribonuklease resistent ist. Deshalb kann aber ein PolyU-Abbau unter physiologischen Bedingungen noch nicht ausgeschlossen werden.

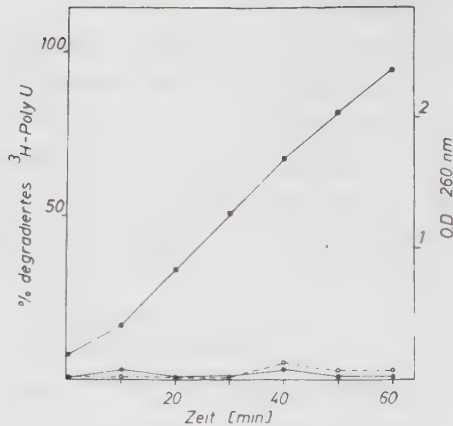


Abb. 38:

Ribosomen wurden mit $^3\text{H-PolyU}$ inkubiert (siehe Material und Methoden).

●—● mit Ribosomen ($^3\text{H-PolyU}$), ○—○ Kontrolle ohne Ribosomen ($^3\text{H-PolyU}$), ■—■ Autodegradation der Ribosomen (OD_{260 nm}).

4.7.5

PolyU-Degradation im zellfreien System

Von Kuwano et al. [31] wurde eine ribosomale Ribonuklease aus *E. coli* beschrieben, die PolyU im zellfreien Protein-synthetisierenden System in 5', 3'-Richtung zu 5'-Uridinmonophosphat degradiert [77]. Außerdem konnten sie zeigen, daß der PolyU-Abbau immer mit der Translation der mRNS gekoppelt war. Mangiarotti und Turco [78] fanden in *E. coli*-Polyribosomen ein Enzym, das ebenfalls während der Translation endogene mRNS zu Alkohol-löslichem Material degradiert.

Diese Untersuchungen werfen die Frage auf, ob auch an Hefe-Polyribosomen gebundene Ribonukleasen zur Degradation von mRNS in der Lage sind. Um die Ribonuklease-Aktivität von Hefe-Riboso-

somen im zellfreien Protein-synthetisierenden System (PolyU-System) zu testen, wurde mit ^3H -PolyU inkubiert. Parallel zum Phenylalanineinbau wurde die Degradation von ^3H -PolyU gemessen. Wie aus Abb. 39 und 40 zu ersehen ist, wurde nur in den ersten 10 min der Inkubation der künstliche Messenger zu säurelöslichem Material abgebaut, während die Proteinbiosynthese 30 min bis 40 min andauerte. Aus diesem Ergebnis und der Tatsache, daß auch ohne die für die Proteinbiosynthese notwendige Energie ^3H -PolyU degradiert wurde (Abb. 39), kann gefolgert werden, daß kein mit der Translation gekoppelter PolyU-Abbau stattgefunden hat.

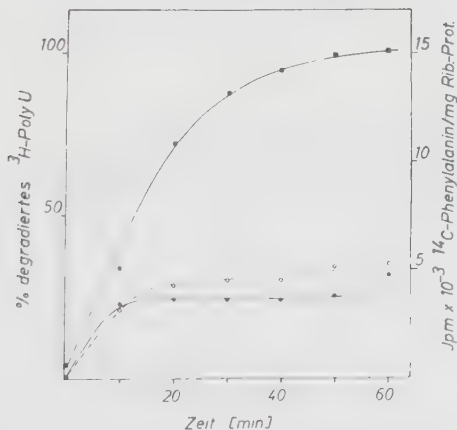


Abb. 39:

Abbau von ^3H -PolyU im zellfreien System.

Inkubationsbedingungen siehe PolyU-System.

■ — ■ ^{14}C -Phenylalanineinbau (Inkubation ohne ^3H -PolyU),

● — ● ^3H -PolyU-Degradation im Gesamtsystem,

○ - - ○ ^3H -PolyU-Degradation ohne Energie.

(Für die Bestimmung der PolyU-Degradation enthielt der Inkubationsansatz außer ^3H -PolyU kein weiteres PolyU).

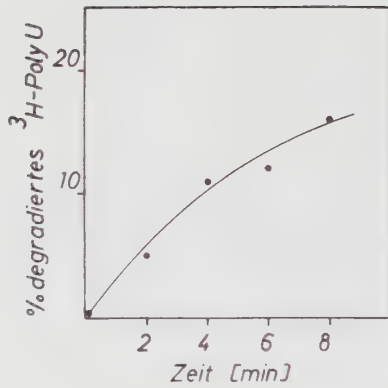


Abb. 40:

Abbau von ^3H -PolyU im zellfreien System.
Inkubationsbedingungen siehe PolyU-System.
(Der Inkubationsansatz enthielt nur ^3H -PolyU).

5. DISKUSSION

Die Isolierung von biologisch aktiven Polyribosomen aus Hefe ermöglichte die Entwicklung eines zellfreien durch endogene mRNS gesteuerten Protein-synthetisierenden Systems, das zu vergleichenden Untersuchungen über die Ionenabhängigkeit von Translation und Transkription herangezogen wurde. Mit diesem System wurde auch der Versuch unternommen, das induzierbare Enzym, saure Phosphatase, von *Schizosaccharomyces pombe* in vitro zu synthetisieren. Ferner wurde eine ribosomale Ribonuklease beschrieben und ihr Einfluß auf die zellfreie Proteinbiosynthese untersucht.

5.1 Polyribosomenisolierung

Als Voraussetzung für die Isolierung von langkettigen Polyribosomen aus Hefe muß eine schonende Methode zum Aufschluß der Zellen zur Verfügung stehen. Marcus und Halvorson [79] konnten nach dem Homogenisieren der Zellen mit Sand oder Glasperlen Polyribosomen im zellfreien Extrakt nachweisen. Mit der Herstellung und Lysis von Sphaeroplasten wurden jedoch bessere Ergebnisse erzielt [49], obwohl dieses Verfahren von den Wachstums- und Inkubationsbedingungen sowie von den Eigenschaften der Hefestämme abhängig ist [50, 51]. Unabhängig von diesen Parametern ist dagegen die Homogenisation mit der French-Press, wie sie in Kap. 3.2.2.1 und Kap. 4.1.1 beschrieben wurde. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Marcus und Halvorson [79] konnte gezeigt werden, daß die French-Press auch für die Darstellung von Polyribosomen geeignet ist. Eine Bedingung für die erfolgreiche Isolierung von Polyribosomen ist die Verwendung von frischen Hefezellen, da das Einfrieren und

Auftauen der Zellen offensichtlich zur Zerstörung schwerer Polyribosomen führt. Dieser Effekt wird vermieden, wenn die Hefen in Puffer A suspendiert und eingefroren werden.

Da nur ca. 15% von der Gesamtmenge der Ribosomen als Polyribosomen vorliegen, war es notwendig, die Polyribosomen zur Anreicherung durch einen Saccharose-Stufengradienten zu zentrifugieren. Der Niederschlag enthielt dann bis zu 95% Polyribosomen. Neben der Anreicherung wurde mit der Zentrifugation auch eine Reinigung der Polyribosomen von nicht gelösten Membranen und unspezifisch adsorbierten Proteinen erreicht.

Zur Charakterisierung der Polyribosomen wurden Sedimentationsanalysen nach RNase-Behandlung durchgeführt (Kap. 4.1.3), die RNS mit 2-¹⁴C-Uracil markiert (Kap. 4.7.1) und die Ribosomen durch steigende KCl-Konzentrationen in 60S- und 40S-Untereinheiten dissoziiert (Kap. 4.7.2.1). Außerdem konnten an den Polyribosomen wachsende Peptidketten nach Inkubation im zellfreien System nachgewiesen werden (Kap. 4.1.4).

5.2 Polyribosomen-abhängiges System

Erste Versuche zur Translation von Hefe-Polyribosomen wurden von Holz [80] unternommen. Gallis und Young [59] erreichten mit einem S-30 System einen 8 bis 10 min andauernden Aminosäureeinbau, während mit dem von Mager und Planta [57] beschriebenen Polyribosomen-abhängigen System bis zu 60 min Proteinsynthese gemessen werden konnte. Die nach der oben beschriebenen Methode isolierten Polyribosomen hatten im zellfreien System ebenfalls eine hohe biologische Aktivität. Der Aminosäureeinbau fand je nach Isolierung innerhalb von 40 min bis zu maximal 90 min statt.

Voraussetzung für ein aktives durch endogene mRNS gesteuertes

zellfreies Protein-synthetisierendes System sind gereinigte Polyribosomen, die nicht durch unspezifisch adsorbierte Ribonukleasen während der Inkubation degradiert werden, und eine Enzymfraktion, die neben Aminoacyl-tRNS-Synthetasen und tRNS auch Initiations- und Elongationsfaktoren enthält. Nachdem für das System die optimalen Konzentrationen der einzelnen Komponenten gefunden waren, konnte mit den Initiations-hemmenden Antibiotika Aurintricarboxylic Acid, Edeine und Natriumfluorid gezeigt werden, daß im Gegensatz zu dem von Gallis und Young [59] beschriebenen System eine Reinitiation der Translation stattfindet. Durch Kontrollexperimente mit Cycloheximid und Chloramphenicol wurde eine Kontamination mit Ribosomen vom 70S-Typ ausgeschlossen.

5.3

Vergleich der optimalen Ionenbedingungen für die zellfreie mRNS- und Proteinsynthese

Von Uttech [26] wurde ein gekoppeltes DNS-abhängiges System beschrieben, das DNS, Ribosomen, Enzyme, tRNS sowie Energie enthielt und mit 8.5 mM $MgCl_2$ (ohne $MnCl_2$) aktiv war. Durch Erhöhung der DNS-Konzentration konnte eine elffache Steigerung des Aminosäureeinbaus erreicht werden. Mit diesem System schien es möglich zu sein, die DNS-abhängige Proteinbiosynthese in vitro nachvollziehen zu können. Mit Untersuchungen von Hagemann und Micheler [64], die eine starke Hemmung der mRNS-Polymerase B durch Ribosomen und Enzymfraktion ergaben, wurde das von Uttech erzielte Ergebnis wieder in Frage gestellt. Dagegen wurde keine Beeinträchtigung der Translation durch DNS oder Polymerase festgestellt [81].

Eine weitere Schwierigkeit für die zellfreie Kopplung von Transkription und Translation besteht in den unterschiedlichen Ionenbedingungen. Im Gegensatz zu gekoppelten *in vitro* Systemen aus *E. coli*, bei denen die Transkription und Translation bei gleicher Magnesiumionenkonzentration ablaufen [11], werden bei Hefe Mangan- bzw. Magnesiumionen benötigt. Ponta et al. [13] fanden für die Transkription von Hefe-DNS eine optimale Konzentration von 1,6 mM MnCl_2 (Polymerase B). Zu dem gleichen Ergebnis führten auch Untersuchungen von Hagemann [63] mit Kalbsthymus-DNS als Template.

Im Hinblick auf die DNS-abhängige Proteinbiosynthese wurde die Ionenabhängigkeit des durch endogene mRNS gesteuerten zellfreien Protein-synthetisierenden Systems untersucht. Übereinstimmend mit den Angaben von Gallis und Young [59] wurde der maximale Aminosäureeinbau mit 6 mM MgCl_2 erreicht. Mager und Planta [57] fanden eine optimale Konzentration von 5 mM MgCl_2 . Es war nun von besonderem Interesse herauszufinden, ob die Möglichkeit besteht, bei der Translation Magnesiumionen ganz oder teilweise durch Manganionen zu ersetzen. Die Abhängigkeit der Proteinbiosynthese von der MnCl_2 -Konzentration wurde deshalb bei 2 mM, 3 mM und 6 mM MgCl_2 getestet. Diese Versuche haben gezeigt, daß die Aminosäureeinbauraten mit steigender MnCl_2 -Konzentration bei optimaler MgCl_2 -Konzentration (6 mM) stark abnimmt. Für ein gekoppeltes DNS-abhängiges System scheint eine Ionenkonzentration von 3 mM MgCl_2 und 1,5 mM MnCl_2 ein vernünftiger Kompromiß zu sein, obwohl die Aminosäureeinbauraten unter diesen Bedingungen nur 50% des optimierten Systems erreichte.

Neben divalenten Ionen werden für die Translation auch Kalium- oder Ammoniumionen benötigt. Die optimale KCl-Konzentration für das Polyribosomen-abhängige System liegt bei 50 mM. Die Abhängigkeit von den monovalenten Ionen ist aber im Vergleich zu der Magnesiumionenkonzentration weitaus weniger ausgeprägt. Ammoniumsulfat, das die Transkription stimuliert [14, 61], senkte den Amino-

säureeinbau im Polyribosomen-abhängigen System um ein Drittel. Hagemann et al. [64] konnten jedoch zeigen, daß in Gegenwart von Ammoniumsulfat bei hohen MgCl_2 -Konzentrationen auch die mRNS-Synthese inhibiert wird, während bei niedrigen MgCl_2 -Konzentrationen eine Stimulierung erfolgt. Wird Ammoniumsulfat durch KCl ersetzt, so stimuliert dies bei niedrigen und hohen MgCl_2 -Konzentrationen.

Obwohl die optimalen Ionenkonzentrationen von Transkription und Translation bei Hefen sehr verschieden sind, scheint es doch möglich zu sein, Bedingungen zu finden, unter denen sowohl die mRNS-Synthese als auch der Aminosäureeinbau in einem zellfreien System nebeneinander ablaufen können.

5.4 Isolierung von Polyribosomen aus Schizosaccharomyces pombe nach Induzierung der sauren Phosphatase

Die in Polyribosomen enthaltene mRNS zeigt bei Sedimentationsanalysen eine heterogene Größenverteilung [37, 80], wie sie bei Hefen, einem einzelligen, omnipotenten Eukaryonten, zu erwarten ist. Wegen der Vielfalt der im Polyribosomen-abhängigen System translatierten mRNS-Arten können keine Aussagen über die Regulation spezifischer Messenger gemacht werden. Es ist aber bekannt, daß in Eukaryontenzellen mRNS-Klassen existieren, die sich hinsichtlich ihres Prozessings voneinander unterscheiden [6, 82]. Für weitergehende Untersuchungen ist es deshalb notwendig, spezifische mRNS in zellfreie Systeme einzusetzen. Es wurden bereits mehrere in vitro Systeme entwickelt, mit denen die Translation von spezifischer mRNS aus spezialisierten Zellen [15-22] gelungen ist. Bei

Hefen und den meisten anderen nicht spezialisierten Eukaryontenzellen liegt die Schwierigkeit darin, aus einer großen Anzahl qualitativ verschiedener, aber mit quantitativ gleichmäßiger Verteilung auftretender mRNS-Arten, einen spezifischen Messenger zu isolieren. Dabei ist es nicht immer notwendig, die mRNS von den Ribosomen zu trennen. Mager und Planta [83] konnten mit in vitro Tests zeigen, daß an leichten Hefe-Polyribosomen vornehmlich ribosomale Proteine synthetisiert werden und gaben damit ein Beispiel für die Charakterisierung von mRNS-Klassen mithilfe von zellfreien Polyribosomen-abhängigen Systemen.

Mit der Induzierung eines Enzyms ist die Möglichkeit gegeben einen Messenger besonders hervorzuheben, Hartlief und Koningsberger [84] induzierten das Maltose-spaltende Enzym α -Glukosidase aus *Saccharomyces carlsbergensis* und isolierten die mRNS aus spezifischen, wachsende α -Glukosidasemoleküle enthaltende Polyribosomen, die durch Immunpräzipitation angereichert waren.

Ein anderes, ebenfalls induzierbares Enzym der Hefe ist die saure Phosphatase. Dieses in der Zellwand lokalisierte Enzym ist ein Glykoprotein [85], dessen Aktivitätsoptimum bei pH 4 liegt. Es wird durch eine hohe Phosphatkonzentration reprimiert und kann durch Phosphat-Entzug induziert werden [65]. Ziel der in Kap. 4, 6 beschriebenen Versuche war es, nach Induzierung der sauren Phosphatase von *Schizosaccharomyces pombe* Polyribosomen zu isolieren und im zellfreien System dieses Enzym zu synthetisieren.

Nachdem es gelungen war die Induzierung des Enzyms mit den Bedingungen für die Polyribosomenisolierung zu kombinieren, konnten die Polyribosomen im in vitro System getestet werden. Sie besaßen eine hohe biologische Aktivität und waren auch zur Reinitiation der Translation befähigt. Das angestrebte Ziel, der Nachweis von in vitro synthetisierter saurer Phosphatase wurde jedoch nicht erreicht. Hierfür sind besonders drei Gründe zu nennen.

- 1.] Die Menge der spezifischen Polyribosomen war nicht ausreichend. Mit Immunprecipitation [86] müßte eine Anreicherung der spezifischen Polyribosomen vorgenommen werden.
- 2.] Da die saure Phosphatase ein Glykoprotein ist, muß auf dem Weg vom Ort der Proteinsynthese zur Zellwand ein Reifungsprozeß stattfinden. Die Umwandlung zum Glykoprotein wird vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum und/oder im Golgiapparat vollzogen [87]. Es muß deshalb angenommen werden, daß das unreife Enzym keine Aktivität besitzt. Versuche mit membrangebundenen sowie von Membranen abgelösten Polyribosomen blieben aber gleichermaßen erfolglos.
- 3.] Außerhalb des Bereichs von pH 3,5 - 5,0 wird die saure Phosphatase irreversibel denaturiert [88]. Das heißt, daß in einem bei pH 7,5. arbeitenden zellfreien Protein-synthetisierenden System das Enzym ohne den Schutz der zellulären Kompartimente wahrscheinlich inaktiviert wird.

Wenn die Reifung der sauren Phosphatase an die Kompartimentierung der Zelle gebunden ist, wird es vorläufig noch nicht möglich sein, in vitro synthetisiertes aktives Enzym nachzuweisen, da der Reifungsprozeß mit den zur Verfügung stehenden zellfreien Systemen nicht nachvollzogen werden kann.

5.5 Ribosomale Ribonukleasen

Das Prozessing und der Abbau von Ribonukleinsäuren erfordert ein steuerbares System mit spezifischen Ribonukleasen, die durch Inhibitoren regulierbar sind oder innerhalb von Zellkompartimenten bzw. an bestimmte Zellorganellen gebunden ihre Funktion ausüben [89]. Ribonukleaseinhibitoren wurden bereits aus Rattenleber-[89-91]

und Hefezellen [92] isoliert. Aber auch Ribonukleasen, die am rRNS-Prozessing [93] beteiligt sind oder einen Einfluß auf die Proteinbiosynthese ausüben [94-96], wurden beschrieben. Am weitesten fortgeschritten sind die Untersuchungen über RNS-hydrolysierende Enzyme von *E. coli*. In der Literatur wurden sechs verschiedene Ribonukleasen beschrieben und ihre Funktion diskutiert.

- 1.] Ribonuklease I [70-72], eine an die ribosomale 30S-Untereinheit gebundene Endonuklease, ist nur aktiv, wenn sie aus dem Ribosom mit EDTA oder Harnstoff herausgelöst wurde. Der Reaktionsmechanismus gleicht dem der Ribonuklease aus Roggengras [97]. Beide Enzyme spalten alle Nukleotidbindungen in Ribonukleinsäuren. Das Endprodukt, Nukleosid-3'-Phosphat, entsteht durch Umwandlung von zyklischen Nukleosid-2',3'-Phosphaten. Zur Degradation von rRNS werden keine divalenten Ionen benötigt. Die biologische Funktion der Ribonuklease I wurde noch nicht geklärt. Es wird aber angenommen, daß sie an dem Ribosomen-Metabolismus beteiligt ist [98].
- 2.] Ribonuklease II ist eine Exonuklease, die an den Ribosomen als auch im S100-Überstand gefunden wurde [99,100]. Im Gegensatz zur Ribonuklease I scheint sie jedoch unspezifisch an die Ribosomen assoziiert zu sein [73]. Sie degradiert einzelsträngige Polynukleotide (PolyA, PolyC, PolyU und rRNS) zu Nukleosid-5'-Phosphaten. Für die Reaktion sind monovalente (KCl oder NH_4Cl) und divalente (MgCl_2 oder MnCl_2) Ionen essentiell. Die Eigenschaften dieses Enzyms lassen es für den Abbau von mRNS geeignet erscheinen.
- 3.] Im Gegensatz zu den anderen RNS-spaltenden Enzymen ist die Ribonuklease III für doppelsträngige RNS spezifisch [101]. Bei der Isolierung sedimentiert sie mit den Ribosomen, ist aber

nicht fest gebunden und läßt sich deshalb leicht mit 200 mM NH_4Cl abwaschen. Sie ist eine Endonuklease, die monovalente (NH_4Cl , KCl oder NaCl) und divalente (MgCl_2 oder MnCl_2) Ionen benötigt. Die Funktion des Enzyms besteht in der Spaltung von mRNS-Vorstufen des DNS-Phagen T7. Nach Rosenberg et al. [102] sind in vivo und in vitro erzeugte Spaltprodukte identisch. Dunn und Studier [103] erklären das gezielte Zerschneiden der Transkriptionsprodukte mit Doppelstrangbereichen in den mRNS-Vorstufen, die für die Ribonuklease III als Erkennungsstelle dienen. Während Hercules et al. [104] nachweisen konnte, daß durch die Behandlung mit Ribonuklease III T3 und T7 Precursor-RNS in translatierbare Messenger umgewandelt werden, fanden Dunn und Studier [105] nur bei einigen bestimmten mRNS-Vorstufen eine effizientere Translation. Neben dem mRNS-Prozessing wird auch eine Beteiligung der Ribonuklease III am rRNS-Prozessing diskutiert [106-107].

- 4.] Ribonuklease IV ist eine sehr spezifisch wirkende Endonuklease. Sie spaltet R17 RNS in zwei bestimmte Fragmente [108].
- 5.] Ribonuklease V, eine Exonuklease, die natürliche und künstliche mRNS unter Proteinbiosynthese-Bedingungen vom 5' zum 3'-Ende zu Nukleosid-5'-Phosphaten abbaut [77, 109], aber keine rRNS degradiert [110], wurde in dem zellfreien Extrakt von *E. coli* gefunden. Für ihre Aktivität, die durch Aurintricarboxylic Acid, Chloramphenicol, Streptomycin, Fusidic Acid und Spectinomycin hemmbar ist [110], werden 50S- und 30S-Untereinheiten sowie Faktor G und T, ferner tRNS, Ammonium- und Magnesiumionen und GTP benötigt [31]. Diese Untersuchungen zeigen, daß Ribonuklease V nur gekoppelt mit der Translation mRNS degradiert.

- 6.] Ceri und Maebe [111] beschrieben eine Endonuklease aus der 50S-Untereinheit von E.coli, die die ribosomale 23S-RNS degradiert, aber kein säurelösliches Material bildet.

Diese an Bakterien-Zellen gewonnenen Erkenntnisse machen deutlich, welche Bedeutung die Ribonukleasen für die Regulation des Zellstoffwechsels besitzen. Es ist aber anzunehmen, daß in Eukaryontenzellen eine noch weitaus größere Anzahl von Ribonukleasen existiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind nur ein erster Anfang der Bemühungen, die zur Aufklärung der Funktion von Ribonukleasen in Hefen unternommen werden. Von besonderem Interesse sind Ribonukleasen, die in einem unmittelbaren Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese stehen.

Die Autodegradation der Polyribosomen wurde auf die Aktivität einer in der 40S-Untereinheit lokalisierten Ribonuklease zurückgeführt. Dieses Enzym benötigt keine divalenten Ionen für die Degradation der rRNS, und es ist nicht dazu befähigt, PolyU im PolyU-System oder unter Autodegradationsbedingungen abzubauen. Diese Eigenschaften zeigen Parallelen zur Ribonuklease I aus E.coli auf. Für die weitere Charakterisierung des Enzyms ist die Isolierung aus dem Ribosom und eine anschließende Reinigung erforderlich.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1] H.G. Wittmann und H. Jokusch, in "Molekularbiologie", eds.
T. Wieland und G. Pfeleiderer, Umschau Verlag, Frankfurt
am Main [1969]
- 2] The Mechanism of Proteinsynthesis and its Regulation, eds. L.
Bosch, North Holland Publ. Comp. [1972]
- 3] S. Ochoa und R. Mazumder, The Enzymes, Vol. X, eds. P.D. Boyer,
Academic Press, New York, London, S. 1-51 [1974]
- 4] J. Lucas-Lenard und L. Beres, The Enzymes, Vol. X, eds. P.D.
Boyer, Academic Press, New York, London, S. 53-86 [1974]
- 5] W.P. Tate und C.T. Caskey, The Enzymes, Vol. X, eds. P.D. Boyer,
Academic Press, New York, London S. 87-118 [1974]
- 6] J.E. Darnell, W.R. Jelinek und G.R. Molloy, Science 181, 1215-1221
[1973]
- 7] F. Jacob und J. Monod, J. Mol. Biol. 3, 318-356 [1961]
- 8] K. Scherrer und L. Marcaud, J. Cell Physiol. 72, Sup. 1, 181-212
[1968]
- 9] P. Chambon, F. Gissinger, C. Keding, J.L. Mandel und M. Meil-
hac, in "The Cell Nucleus", Vol. III, eds. H. Busch, Aca-
demic Press, New York, London, S. 269-308 [1974]
- 10] Proteinbiosynthesis in Nonbacterial Systems, eds. J.A. Last und
A.J. Laskin, Marcel Dekker, New York [1972]
- 11] P. Herrlich und M. Schweiger, Methods in Enzymology, XXX,
654-669 [1974]
- 12] A.H. Scragg und D.Y. Thomas, Eur. J. Biochem. 56, 183-192 [1975]

- 13] H.Ponta, U. Ponta, V. Kraft und E. Wintersberger, Eur.J.Biochem. 46, 473-479 [1974]
- 14] U. Wintersberger, P. Schmith und K. Letnansky, Eur.J.Biochem. 33, 123-130 [1973]
- 15] D. Laycock und J.A.Hunt, Nature 221, 1118-1122 [1969]
- 16] R.E.Lockard und J.B. Lingrel, Nature NB 233, 204-206 [1971]
- 17] M.B. Mathews, M. Osborn und J.B. Lingrel, Nature NB 233, 206-209 [1971]
- 18] J.B.Gurdon, C.D.Lane, H.R. Woodland und G. Marbaix, Nature 233, 177-182 [1971]
- 19] H. Bloemendal, A. Berns, G. Strous, M. Mathews und C.D.Lane, 8. FEBS Meeting, Amsterdam, 1972, North Holland Publ. Comp., 237-250 [1972]
- 20] R.E. Rhoads, G.S. McKnight und R.T. Schimke, J.Biol.Chem. 246, 7407-7410 [1971]
- 21] G. Schütz, M. Beato und P. Feigelson, Methods in Enzymology, XXX, 701-708 [1974]
- 22] S.M. Heywood, Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 34, 799-803 [1969]
- 23] A.Micheler, Dissertation, Freie Universität Berlin [1972]
- 24] P. Wurmbach, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin [1975]
- 25] S. Nishiyama-Watanabe, Dissertation, Freie Universität Berlin [1976]
- 26] K.Uttech, Dissertation, Freie Universität Berlin [1972]
- 27] H. Lothar, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin [1973]
- 28] B. Schulz-Harder, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin [1973]
- 29] K.Angermann, U.Grundmann und H.Holz, Z.Naturforschg. 31c, 85-90 [1976]

- 30] G.F.Stärk und L. Jaenicke, Z.Naturforschg. 26b, 328-336 [1971]
- 31] M. Kuwano, C.N. Kwan, D. Apirion und D. Schlessinger, Proc. Nat.Acad.Sci. USA 64, 693-700 [1969]
- 32] S.A.Udem und J.R. Warner, J.Biol.Chem. 248, 1412-1416 [1973]
- 33] J. Retel und R.J.Planta, Biochim.biophys.Acta 224, 458-469 [1970]
- 34] H.Ponta, U.Ponta und E. Wintersberger, FEBS Letters 18, 204-208 [1971]
- 35] B.Groner und S.L. Phillips, J.Biol.Chem. 250, 5640-5646 [1975]
- 36] C.S. McLaughlin, J.R. Warner, M.Edmonds, H.Nakazato und M.H. Vaughan, J.Biol.Chem. 248, 1466-1471 [1973]
- 37] J.Reed und E. Wintersberger, FEBS Letters 32, 213-217 [1973]
- 38] W. Laskowski, Z.Naturforschg. 17b, 93-108 [1962]
- 39] Der Stamm wurde uns freundlicherweise von A.Koty, Prag, zur Verfügung gestellt
- 40] U.Reichert, Zbl.Bakteriol.Parasitenk.Abt.I.Org. 205, 63-68 [1967]
- 41] Der Stamm wurde uns freundlicherweise von R. Schmidt, Berlin, zur Verfügung gestellt
- 42] J.M.Mitchison und P.R. Gross, Exp.Cell Res.37, 259-277 [1965]
- 43] A.K.Falvey und T. Staehelin, J.Mol.Biol. 53, 1-19 [1970]
- 44] H.Noll, Techniques in Protein Biosynthesis, Vol.2, eds. P.N.Campbell und J.R.Sargent, Academic Press, New York, London, S.101-179
- 45] T.Uchida und F.Egami, in "Procedures in Nucleic Acid Research", eds. Cantoni und Davies, Harper and Row, New York [1966]
- 46] A.Torriani, Biochim.biophys.Acta 38, 460-469 [1960]
- 47] M.M.Bhargava und H.O.Halvorson, J.Cell Biol. 49, 423-429 [1971]

- 48] C.Herrmann, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin [1976]
- 49] H.T.Hutchison und L.H.Hartwell, J.Bacteriol. 94, 1697-1705 [1967]
- 50] M.M.Shahin, J.Bacteriol. 110, 769-771 [1972]
- 51] H.Holz und L.Scholing, Z.Naturforschg. 30c, 516-519 [1975]
- 52] J.M.Lucas, A.H.W.M. Schuurs und M.V.Simpson, Biochem. 3, 959-967 [1964]
- 53] G.W.Dietz, B.R. Reid und M.V. Simpson, Biochem. 4, 2340-2350 [1965]
- 54] G.D.Rock und B.F. Johnson, Can.J.Microbiol. 16, 187-191 [1970]
- 55] T.Staehelin, C.C.Brinton, F.O. Wettstein und H.Noll, Nature 199, 865-870 [1963]
- 56] F.O. Wettstein, T. Staehelin und H.Noll, Nature 197, 430-435 [1963]
- 57] W.H.Mager und R.J.Planta, Biochim.biophys.Acta 402, 105-112 [1975]
- 58] S. Ochoa, Naturwiss. 55, 505-514 [1968]
- 59] B.M.Gallis und E.T.Young, J.Bacteriol. 122, 719-726 [1975]
- 60] D. Vazques, FEBS Letters 40, Suppl., 63-84 [1974]
- 61] H.Ponta, U.Ponta und E. Wintersberger, Eur.J.Biochem. 29, 110-118 [1972]
- 62] Th.M.Brogt und R.J.Planta, FEBS-Letters 20, 47-52 [1972]
- 63] U.Hagemann, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin [1974]
- 64] U.Hagemann und A.Micheler, in Vorbereitung
- 65] R.Schmidt und S. Jannsen, Biochim.biophys.Acta 362, 13-16 [1974]
- 66] T.E.Martin und L.H.Hartwell, J. Biol. Chem. 245, 1504-1508 [1970]
- 67] M.H.Schreier und T.Staehelin, J.Mol.Biol. 73, 329-349 [1973]

- 68] B.A.M. van der Zeijst, A.J.Kool und H.P.J.Bloemers, Eur.J. Biochem. 30, 15-25 [1972]
- 69] R.Becker, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, in Vorbereitung
- 70] D.Elson und M.Tal, Biochim.biophys.Acta 36, 281-282 [1959]
- 71] P.F.Spahr und B.R. Hollingworth, J.Biol.Chem.236, 823-831 [1961]
- 72] M.Tal und D.Elson, Biochim.biophys.Acta 76, 40-47 [1963]
- 73] R.V.Krishna, T.S.Ko, B. Meyhack und D.Apirion, FEBS Letters 29, 105-118 [1973]
- 74] G.D.Krechetova, I.A.Chudinova und V.S.Shapot, Biochim.bio-phys.Acta 277, 161-178 [1972]
- 75] O.C.Ingebretsen, P.Eker und A.Pihl, FEBS Letters 25, 217-220 [1972]
- 76] N.Käufer, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, in Vorbereitung
- 77] M.Kuwano, D.Schlessinger und D.Apirion, J.Mol.Biol.51, 75-82 [1970]
- 78] G.Mangiarotti und E.Turco, Eur.J.Biochem. 38, 507-515 [1973]
- 79] L.Marcus und H.O.Halvorson, Methods in Enzymology, VII, 498-502 [1967]
- 80] H.Holz, Dissertation, Freie Universität Berlin [1974]
- 81] B.Schulz-Harder, unveröffentlichte Ergebnisse
- 82] B.Puschendorf, Biologie in unserer Zeit 5, 139-145 [1974]
- 83] W.H.Mager und R.J.Planta, Eur.J.Biochem.62, 193-197 [1976]
- 84] R.Hartlief und V.V.Koningsberger, Biochim.biophys.Acta 166, 512-531 [1968]
- 85] F.C.Odds und J.C.Hierholzer, J.Bacteriol.114, 257-266 [1963]

- 86] D.B.Cowie, S.Spiegelmann, R.B.Roberts und J.D.Duerksen,
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 47, 114-122 [1961]
- 87] D.H.Northcote, in "Cell Biology in Medicine", eds. E.E.Bittar,
John Wiley and Sons, New York, S.197-214 [1973]
- 88] P.Boer und E.P. Steyn-Parvé, Biochim.biophys.Acta 128, 400-402
[1966]
- 89] E.A.Barnard, Ann.Rev.Biochem.38, 677-732 [1969]
- 90] P.Eker und A. Pihl, FEBS Letters 16, 60-62 [1971]
- 91] C.Gagnon, G. Lalonds und G.de Lamirande, Biochim.biophys.
Acta 353, 323-333 [1974]
- 92] A.Imada, A.J.Sinsky und S.R.Tannenbaum, Biochim.biophys.
Acta 268, 674-679 [1972]
- 93] M.E. Mirault und K.Scherrer, FEBS Letters 20, 233-238 [1972]
- 94] M. Rieber und N. Pazmino, Biochim.biophys.Acta 232, 410-418 [1971]
- 95] D.B. Willis und J.L.Starr, Biochim.biophys.Acta 262, 181-188 [1972]
- 96] A.R.Hunter und A. Korner, Biochim.biophys.Acta 169, 488-493
[1968]
- 97] L. Shuster, H.G. Khorana und L.A.Heppel. Biochim.biophys.
Acta 33, 452-461 [1959]
- 98] D.Elson, Biochim.biophys.Acta 36, 372-386 [1959]
- 99] P.F. Spahr, J.Biol.Chem. 239, 3716-3726 [1964]
- 100] M.F.Singer und G.Tolbert, Biochem. 4, 1319-1330 [1965]
- 101] H.D.Robertson, R.E. Webster und N.D. Zinder, J. Biol. Chem. 243,
82-91 [1968]
- 102] M.Rosenberg, R.A.Kramer und J.A. Steitz, J.Mol.Biol. 89,
777-782 [1974]

- 103] J.J.Dunn und F.W. Studier, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70,
1559-1563 [1973]
- 104] K.Hercules, M.Schweiger und W.Sauerbier, Proc.Nat.Acad.Sci.
USA 71, 840-844 [1974]
- 105] J.J.Dunn und F.W. Studier, J.Mol.Biol. 99, 487-499 [1975]
- 106] J.J.Dunn und F.W. Studier, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 70, 3296-
3300 [1973]
- 107] N. Nikolaev, R. Silengo und D. Schlessinger, J.Biol.Chem. 248,
7967-7969 [1973]
- 108] R.F.Gesteland und P.F.Spahr, Cold Spring Harbor Symp.Quant.
Biol. 34, 707-716 [1969]
- 109] G.Mangiarotti, D.Schlessinger und M.Kuwano, J.Mol.Biol.60,
441-452 [1971]
- 110] M. Kuwano, D.Schlessinger und D.Apirion, Nature 226, 514-516 [1970]
- 111] H.Ceri und P.Y. Maeba, Biochim.biophys.Acta 312, 337-384 [1973]

Für die Unterstützung und anregende Diskussionen während der Durchführung der Arbeit danke ich Randolph Lochmann und allen Mitarbeitern im Haus 5 des Zentralinstituts für Biochemie und Biophysik sehr herzlich.

Lebenslauf

Am 5. September 1947 wurde ich als drittes Kind des Diplom-Ingenieurs Rudolf Schulz-Harder und seiner Ehefrau Ilse, geb. Broscheit, in Berlin geboren. Im Frühjahr 1954 wurde ich eingeschult. Nach 6 Jahren Grundschule besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Droste-Hülshoff-Oberschule in Berlin, an der ich 1967 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend leistete ich die für das Studium des Bauingenieurs erforderliche praktische Arbeit. Zum Wintersemester 1967/68 ließ ich mich an der Technischen Universität Berlin immatrikulieren, wechselte aber bereits zum Sommersemester 1968 zur Freien Universität Berlin, um dort Biologie zu studieren. Im April 1973 habe ich das Hauptstudium mit der Diplomprüfung beendet.

Seit dem Mai 1974 bin ich mit Victoria Prempeh verheiratet.

Die vorliegende Arbeit wurde ab Juni 1973 in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E.-R. Lochmann angefertigt.

In der Zeit von Juni 1973 bis Mai 1975 habe ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz erhalten.

